

**Molekulare Charakterisierung der chronischen myeloischen  
Leukämie im Kindesalter und bei jungen Erwachsenen**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae  
(Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Melinda Busch  
geboren am 17.11.1990 in Pforzheim**

Gutachter:

1. PD Dr. med. Thomas Ernst, Universitätsklinikum Jena
2. Prof. Dr. med. Bernd Gruhn, Universitätsklinikum Jena
3. Prof. Dr. med. Meinolf Suttorp, Universitätsklinikum Dresden

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.01.2019

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>3</b>
1.1 Charakteristik der CML im Kindesalter.....	4
1.2 Therapiemöglichkeiten .....	5
1.3 Molekulargenetische Aspekte .....	7
<b>2 Ziele der Arbeit .....</b>	<b>10</b>
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>11</b>
<b>3.1 Material.....</b>	<b>11</b>
3.1.1 Patientenmaterial.....	11
3.1.2 Chemikalien .....	15
3.1.3 Lösungen.....	15
3.1.4 Primer.....	16
3.1.5 Kits.....	17
3.1.6 Geräte .....	18
3.1.7 Software .....	18
<b>3.2 Methoden .....</b>	<b>19</b>
3.2.1 DNA-Isolation.....	19
3.2.1.1 DNA-Isolation aus Leukozyten .....	19
3.2.1.2 DNA-Isolation aus Mundspeichel.....	19
3.2.2 Konzentrationsmessung .....	19
3.2.3 Whole Genome Amplification.....	20
3.2.4 Auswahl der Gene.....	20
3.2.5 Polymerasekettenreaktion .....	22
3.2.6 <i>JAK2</i> -Sensitivitätskontrollen .....	23
3.2.7 Gelelektrophorese .....	24
3.2.8 Next Generation Sequencing (NGS).....	24
3.2.9 Kolonie-Stammzell-Assay .....	26
3.2.10 Sanger-Sequenzierung .....	27
3.2.11 FISH-Analyse .....	28
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>29</b>

<b>4.1 Technische Auswertung.....</b>	<b>29</b>
4.1.1 DNA-Isolation.....	29
4.1.2 Whole Genome Amplification.....	29
4.1.3 Polymerasekettenreaktion.....	29
4.1.4 Next Generation Sequencing .....	30
4.1.5 <i>JAK2</i> V617F Sensitivitätskontrollen .....	32
<b>4.2 Mutationen.....</b>	<b>34</b>
4.2.1 Mutationen mit funktioneller Auswirkung .....	34
4.2.2 Mutationen ohne funktioneller Auswirkung (SNPs und <i>silent mutations</i> ).....	37
<b>4.3 Kolonie-Stammzell-Assay.....</b>	<b>46</b>
4.3.1 Kolonienwachstum .....	46
4.3.2 Mutations- und <i>BCR-ABL1</i> -Nachweis.....	47
<b>4.4 Kontrolle der Mutationskinetik unter Therapie.....</b>	<b>49</b>
<b>4.5 Korrelation der <i>ASXL1</i>-Mutationen mit klinischen Verläufen .....</b>	<b>50</b>
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>52</b>
<b>6 Schlussfolgerung und Ausblick.....</b>	<b>62</b>
<b>7 Literatur- und Quellenverzeichnis .....</b>	<b>63</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>II</b>
<b>Primerverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>XXII</b>
<b>Ehrenwörtliche Erklärung.....</b>	<b>XXIII</b>
<b>Publikation.....</b>	<b>XXIV</b>
<b>Präsentationen.....</b>	<b>XXIV</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ABL1	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
allo SCT	allogene Stammzelltransplantation
AML	Akute myeloische Leukämie
ASXL1	<i>Additional sex combs like 1</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAP1	<i>BRCA1 associated protein 1</i>
BCR	<i>Breakpoint cluster region</i>
bp	Basenpaare
BRAF	<i>B-Raf proto-oncogene</i>
CALR	<i>Calreticulin</i>
CBL	<i>Casitas B lineage lymphoma proto-oncogene</i>
CCA	<i>Clonal cytogenetic abnormalities</i>
CCD Kamera	<i>Charge-coupled device</i> Kamera
CCyR	Komplette zytogenetische Remission
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMML	Chronische myelomonozytäre Leukämie
CMR	Komplette molekulare Remission
CSF3R	<i>Colony stimulating factor 3 receptor</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT3A	<i>DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha</i>
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
emPCR	Emulsions - PCR
ETV6	<i>ETS variant 1</i>
EZH2	<i>Enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FISH	Fluoreszenz - <i>in situ</i> - Hybridisierung
FLT3	<i>Fms related tyrosine kinase 3</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>

HCl	Salzsäure
IDH1	<i>Isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 1, cytosolic</i>
IDH2	<i>Isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 2, mitochondrial</i>
IGF1	<i>Insuline-like-growth-factor 1</i>
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
JAK2	<i>Janus kinase 2</i>
k.A.	keine Angabe
KIT	<i>KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase</i>
KRAS	<i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LNK	<i>Lymphocyte specific adapter protein lnk</i>
M-BCR-ABL	<i>major breakpoint cluster region</i>
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MID-Primer	<i>multiplex identifier Primer</i>
MNC	mononukleäre Zellen
MPL	<i>MPL proto-oncogene, thrombopoietin receptor</i>
MPN	Myeloproliferative Neoplasie
MA	Mundabstrich
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NOTCH1	<i>Notch homolog 1</i>
NPM1	<i>Nucleophosmin</i>
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>
p53	<i>Tumor protein p53</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Ph	Philadelphia-Chromosom
PRC2	<i>Polycomb repressive complex 2</i>
PTP	<i>Pico Titer Plate</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RT-PCR	<i>Real Time-Polymerase Chain Reaction</i>
RUNX1	<i>Runt related transcription factor 1</i>
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat

SETBP1	<i>SET binding protein 1</i>
SF3B1	<i>Splicing factor 3b subunit 1</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SRSF2	<i>Serine/arginine-rich splicing factor 2</i>
STAG2	<i>Stromal antigen 2</i>
TAE-Puffer	Tris (hydroxymethyl)-amonimethan-Acetat-EDTA Puffer
TE-Puffer	Tris EDTA-Puffer
TET2	<i>Tet methylcytosine dioxygenase 2</i>
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TP53	<i>Tumor protein P53</i>
U2AF35	<i>U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1</i>
ÜL	Überleben
UTX	<i>Lysine (K)-specific demethylase 6A</i>
WES	<i>Whole Exome Sequencing</i>
WGA	<i>Whole Genome Amplification</i>
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT1	<i>Wilms tumor 1</i>
ZRSR2	<i>Zinc finger CCCH-type, RNA binding motif and serine/arginine rich 2</i>

## Zusammenfassung

Die chronische myeloische Leukämie (CML) ist gekennzeichnet durch die unkontrollierte Vermehrung von Granulozyten und deren Vorstufen. Bei mehr als 95% der Patienten kann die reziproke Translokation  $t(9;22)(q34;q11)$  mit dem verkürzten Chromosom 22 (Philadelphia-Chromosom) nachgewiesen werden. Hierdurch kommt es zur *BCR-ABL1*-Genfusion mit dem *BCR-ABL*-Fusionsprotein. Dieses führt zu einer gesteigerten Tyrosinkinaseaktivität mit verminderter Apoptose und unkontrollierter Zellproliferation. Der Einfluss der *BCR-ABL1*-Translokation auf die Pathogenese der CML ist bekannt, jedoch ist unklar, durch welche Einflüsse die *BCR-ABL1*-Translokation initial entsteht. Durch die Entwicklung *BCR-ABL1*-selektiver Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) ist seit 2001 eine wirksame Therapie mit zielgerichtetem Ansatz auf molekulargenetischer Ebene möglich (Hehlmann et al. 2007).

Aufgrund ihrer Seltenheit (Inzidenz 1/1.000.000 Einwohner pro Jahr) weist die CML im Kindesalter eine weniger umfangreiche Studienlage auf als die CML im Erwachsenenalter. Viele diagnostische und therapeutische Standards wurden aus der Erwachsenenmedizin übernommen (Suttorp und Millot 2010). Klinisch ist die CML im Kindesalter die aggressivere Form (Hijiya et al. 2016). Auch auf molekularbiologischer Ebene wurden Unterschiede detektiert (Krumbholz et al. 2012).

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurden erwachsene CML-Patienten auf *BCR-ABL1*-unabhängige Zusatzmutationen untersucht. Dabei wurden Mutationen in den Genen *ASXL1*, *DNMT3A*, *EZH2*, *RUNX1*, *TET2*, *TP53*, *U2AF1* und *ZRSR2* identifiziert (Schmidt et al. 2014). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese einer Mehrschrittpathogenese der CML, wonach erst ein Ereignis wie beispielsweise eine Mutation in einem epigenetischen Regulatorgen erfolgt, und danach die *BCR-ABL1*-Translokation zum Ausbruch der Erkrankung führt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Prävalenz, Kinetik und prognostischen Bedeutung solcher Mutationen bei der CML im Kindesalter und in jungen Erwachsenen. Hierzu wurde Leukozyten-DNA von 21 CML-Patienten (männlich, n = 15; Altersmedian 14 Jahre, Bereich 0 - 27 Jahre) bei Erstdiagnose molekulargenetisch analysiert. Der zweite Schritt umfasste die Verifizierung der gefundenen Mutationen. Danach konnten an einem Patienten Klonalitätsuntersuchungen durchgeführt werden. An einem weiteren



Patienten wurde die Mutationskinetik im Krankheitsverlauf unter TKI-Therapie analysiert. Schließlich wurde das Auftreten der gefundenen Mutationen mit dem Gesamtüberleben der Patienten innerhalb der Kohorte in Korrelation gesetzt.

Als Methode zur Mutationsdetektion wurde das *Next Generation Sequencing* (NGS) angewendet. Mit dem in der Arbeitsgruppe etablierten Jena-Leukämie-Panel ist eine sensitive und simultane Analyse der 30 häufigsten Leukämie-assoziierten Gene in einem Lauf möglich (Rinke et al. 2013, Schafer et al. 2016). Es wurden Gene aus den Bereichen Signaltransduktion, Transkriptionsfaktoren, RNA-Splicing-Komplex und Cohesin-Komplex untersucht. Um den somatischen Ursprung der gefundenen Mutationen zu verifizieren, wurde DNA aus Mundabstrichen isoliert und die Mutationen mittels NGS bzw. Sanger-Sequenzierung ausgeschlossen. Für die Klonalitätsuntersuchungen wurden im Rahmen eines Kolonie-Stammzell-Assays kryokonservierte mononukleäre Zellen (MNC) in Methylzellulose-Medium kultiviert. Aus individuell gepickten Kolonien wurde DNA amplifiziert. Mithilfe der Sanger-Sequenzierung wurde der Mutationsstatus einzelner Kolonien überprüft. Zum *BCR-ABL1*-Nachweis diente die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungs-(FISH)-Analyse.

Bei sechs von 21 Patienten (29%) konnten Mutationen detektiert werden. Alle Mutationen waren im Gen *ASXL1* lokalisiert. Darunter fanden sich zwei Deletionen und drei Nonsense-Mutationen. Da die Mutationen in Mundabstrichen nicht nachweisbar waren, handelte es sich um somatische Mutationen. Klonalitätsanalysen zeigten, dass die *ASXL1*-Mutation und die *BCR-ABL1*-Genfusion auf demselben Zellklon lagen. Jedoch wurden auch Zellklone ohne *ASXL1*-Mutation, welche *BCR-ABL1*-positiv waren, detektiert. Dies kann als Hinweis darauf gedeutet werden, dass die *ASXL1*-Mutation als sekundäres Ereignis auftrat.

Schlussfolgernd kann festgehalten werden, dass *ASXL1*-Mutationen häufig bei der CML im Kindesalter und in jungen Erwachsenen nachgewiesen werden können. Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese einer Mehrschrittpathogenese, wobei *ASXL1*-Mutationen als sekundäres Ereignis auftreten können. Für die Entstehung und Progression der Erkrankung könnten die Mutationen eine wichtige Rolle spielen. Sie könnten die Therapie beeinflussen oder einen neuen therapeutischen Angriffspunkt liefern. Weitere Forschung auf dem Gebiet der CML im Kindesalter sowie größere Patientengruppen sind notwendig, um die klinischen Verläufe der Erkrankung mit den molekulargenetischen Charakteristiken in Korrelation zu setzen und deren Einfluss auf das Ansprechen einer Therapie zu untersuchen.

# 1 Einleitung

Entsprechend der Einteilung der Weltgesundheitsorganisation (WHO) gehört die CML zu den Myeloproliferativen Neoplasien (MPN). Dazu gehören ebenfalls Polycythaemia vera, essentielle Thrombozythämie, primäre Myelofibrose, chronische Eosinophilenleukämie, chronische Neutrophilenleukämie sowie unklassifizierbare MPN (Barbui et al. 2018). Diese Erkrankungen sind durch die unkontrollierte Proliferation einer oder mehrerer Vertreter der myeloiden Zellreihe gekennzeichnet.

Die CML nimmt ihren Ausgang von der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle des Knochenmarks. Es tritt eine monoklonale Stammzellentartung der myeloischen Zellreihe auf, die mit fortgeschrittener Erkrankung den gesunden Zellklon verdrängt und die normale Hämatopoese unterdrückt. Dabei charakterisieren die Vermehrung der Granulozyten und deren Vorstufen die CML.

Bei mehr als 95% der Patienten kann die reziproke Translokation  $t(9;22)(q34;q11)$  mit Veränderung des Chromosoms 22 nachgewiesen werden (Hochhaus, La Rosée et al. 2015). Diese wurde erstmals 1960 von Peter C. Nowell und David Hungerford in Leukozyten von CML-Patienten gefunden und nach dem Ort der Entdeckung als Philadelphia-Chromosom (Ph) benannt (Nowell und Hungerford 1960). Als Folge der chromosomalen Neuordnung liegen die Gene der *Abelson-Tyrosinkinase* (*ABL*) und die *Breakpoint-Cluster-Region* (*BCR*) nebeneinander und bilden das *BCR-ABL1*-Fusionsgen mit gesteigerter Tyrosinkinase-Aktivität. Diese ist die Ursache für die neoplastische Umwandlung der hämatopoetischen Stammzelle. Es folgen eine unkontrollierte Zellproliferation und verringerte Apoptose (Ren 2005, Hochhaus, La Rosée et al. 2015). Die zentrale Rolle des *BCR-ABL1*-Fusionsgens in der Pathogenese der CML konnte im Mausmodell bestätigt werden. Dabei führte der retrovirale Gentransfer von *BCR-ABL1* in bestrahltes Knochenmark zu einer CML-ähnlichen myeloproliferativen Erkrankung (Daley et al. 1990).

Seit 2001 gibt es mit Imatinib eine wirksame Therapie, die als TKI zielgerichtet auf molekulargenetischer Ebene der CML-Pathogenese ansetzt. Dieser Durchbruch veränderte weltweit die Therapie der CML. Es konnten erstmals molekulargenetische Erkenntnisse auf den Therapieansatz einer Erkrankung übertragen werden. Somit stellt die CML aufgrund ihrer Biologie, des klinischen Verlaufs und der Therapiemöglichkeit eine Modellerkrankung für andere Neoplasien dar (Hehlmann et al. 2007).

## 1.1 Charakteristik der CML im Kindesalter

Die adulte CML tritt mit einer Inzidenz von 1,5/100.000 Einwohnern pro Jahr auf und betrifft bei einem Erkrankungsgipfel von 55 bis 60 Jahren vor allem ältere Patienten (Hochhaus, La Rosée et al. 2015). Im Gegensatz dazu ist die CML im Kindesalter mit einer Inzidenz von etwa 1/1.000.000 Einwohnern pro Jahr eine deutlich seltenere Erkrankung. Sie steigt mit zunehmendem Alter von 0,7/1.000.000 Einwohner pro Jahr in der Gruppe der 1- bis 14-Jährigen auf 1,2/1.000.000 Einwohner pro Jahr im Adoleszentenalter (Suttorp und Millot 2010). Insgesamt fallen weniger als 3% aller Leukämieformen im Kindesalter auf die CML (Suttorp und Millot 2010). Sie tritt mit einem Geschlechterverhältnis von 1,5 (männlich zu weiblich) etwas häufiger bei Jungen auf (Millot et al. 2005). Die Erstdiagnose beider Geschlechter wird bei einem medianen Alter von 11 - 12 Jahren gestellt (Bereich 1 - 18 Jahre). Leitsymptome der Erkrankung sind allgemeine Körperschwäche, Beschwerden im Milzbereich, Gewichtsverlust und Blutungen (Suttorp und Millot 2010). Wie auch die adulte CML manifestiert sich die CML im Kindes- und Adoleszentenalter in drei aufeinanderfolgenden klinischen Erkrankungsphasen. Die chronische Phase ist durch eine Leukozytose mit Splenomegalie geprägt, häufig zeigt sich eine Anämie (Hochhaus, La Rosée et al. 2015). Wenn keine Therapie erfolgt und die ungehemmte Proliferation nicht eingeschränkt wird, geht die Erkrankung typischerweise in die akzelerierte Phase über und erreicht innerhalb von 3 - 5 Jahren die Blastenkrise als finale Phase (Gurrea Salas et al. 2015). Für die Diagnose der akzelerierten Phase sind der Blastenanteil von 15 - 29% im peripheren Blut oder Knochenmark, die Summe von Blastenanteil und Promyelozytenanteil in Blut oder Knochenmark von mehr als 30% (mit < 30% Blasten), der Basophilenanteil im peripheren Blut > 20% oder eine nicht therapiebedingte persistierende Thrombozytopenie ausschlaggebend (Baccarani et al. 2006). Die Blastenkrise verläuft in 60 - 80% der Fälle myeloisch und in 20 - 30% der Fälle lymphatisch, es werden aber auch gemischte Linien-Phänotypen beobachtet (Suttorp und Millot 2010). Diagnosekriterien der Blastenkrise sind ein Blastenanteil von > 30% im peripheren Blut oder Knochenmark (Baccarani et al. 2006). Klinisch zeigt sich die CML im Kindes- und Adoleszentenalter im Vergleich zur CML im Erwachsenenalter als die aggressivere Form. Zum Diagnosezeitpunkt wird über hohe Leukozytenzahlen, hohe Thrombozytenzahlen und hohe Blastenanteile berichtet (Millot et al. 2005). Je jünger die Patienten, umso größer ist die metrische Vergrößerung der Milz und

umso höher ist die Inzidenz der Splenomegalie (Castagnetti et al. 2015). Eine Studie der Arbeitsgruppe um Kalmanti et al. zeigte in Analogie zu dieser Erkenntnis, dass die Altersgruppe der 16- bis 29-jährigen CML-Patienten häufiger Symptome der Organomegalie, eine stärker vergrößerte Milz, eine höhere Leukozytenzahl, einen höheren Blastenanteil und geringere Hämoglobinwerte als die höheren Altersgruppen aufwiesen (Kalmanti et al. 2014). Außerdem werden nach dem altersunabhängigen EUTOS-Score mehr junge Patienten als Hochrisikogruppe eingestuft (Castagnetti et al. 2015). Bei bis zu 10% der pädiatrischen Patienten tritt eine Leukostase auf (Kurosawa et al. 2016).

Weiterhin sind Anämien und Thrombozytosen bei Kindern und Adoleszenten häufiger (Milot et al. 2005) und es werden insgesamt mehr Patienten in der fortgeschrittenen Phase der Erkrankung (akzelerierte Phase oder Blastenkrise) detektiert (Suttorp und Milot 2010).

Die klinischen Unterschiede können auf eine unterschiedliche Pathogenese bzw. Biologie der beiden CML-Formen hinweisen (Kalmanti et al. 2014). Die Krankheitsentstehung muss in beiden Altersgruppen weiter untersucht werden. Aufgrund ihrer Seltenheit ist die Studienlage der pädiatrischen CML weniger umfangreich als die der adulten CML. Somit wurden viele diagnostische und therapeutische Standards aus der Erwachsenenmedizin übernommen. Jedoch sind nicht alle Standards auf die pädiatrische CML übertragbar. Salas et al. konnten dies verdeutlichen, bei der Anwendung der Scoring Systeme Sokal, Hasford und EUTOS an einer pädiatrischen Kohorte traten Diskrepanzen auf (Gurrea Salas et al. 2015).

## 1.2 Therapiemöglichkeiten

Aufgrund der lückenhaften Studienlage zur CML im Kindesalter werden pädiatrische Patienten oft nach Standards der CML im Erwachsenenalter behandelt. Dabei gibt es wesentliche Unterschiede in klinischer Manifestation, Progression und therapeutischem Ansprechen. Vor der Imatinib-Ära war die allogene Stammzelltransplantation die einzige Therapie mit kurativem Ansatz für CML-Patienten. Komplikationen der Stammzelltransplantation sind schwerwiegende Infektionen, Infertilität, Lungenfibrose, endokrinologische und Wachstumsstörungen, das metabolische Syndrom sowie akute und chronische Formen der Graft-versus-Host-Reaktion (Hijiya et al. 2016). Die Überlebenswahrscheinlichkeit nach Stammzelltransplantation hat sich mit der Zeit verbessert, dennoch ist das klinische Ergebnis transplantierte Patienten stark von Erkrankungsphase, Alter des Patienten, Spendertyp, Geschlechterkombination aus Spender und Empfänger und

dem Zeitintervall zwischen Diagnose und Transplantation abhängig (Gratwohl et al. 2006). Als alternative Therapiemöglichkeit konnte in den 90er Jahren Interferon alpha mit Cytarabin eingesetzt werden, was bei den pädiatrischen Patienten zu ähnlich guten Ergebnissen wie bei den Erwachsenen führte (Milot et al. 2002).

Wie bereits beschrieben, revolutionierte die Entwicklung von Imatinib die Therapie der CML grundlegend. Durch den Einsatz der TKI und die entsprechende molekulargenetische Überwachung haben sich Behandlungserfolg und Überlebensrate bedeutend verbessert. Therapieziel ist die Reduktion bzw. Eradikation der *BCR-ABL1*-positiven Klone. Der Therapieerfolg kann durch die zytogenetische Auszählung des Philadelphia-Chromosoms und die Messung der *BCR-ABL1*-Transkripte mittels *real-time polymerase chain reaction* (RT-PCR) und überwacht werden. Da sich Imatinib gegenüber Interferon alpha als erfolgreichere Therapie erwies, wurde es als Standardmedikation der CML-Therapie etabliert (O'Brien et al. 2003). Auch bei Langzeittherapie über mehr als 10 Jahre blieb die Effektivität des Medikaments erhalten. Über 80% der Patienten zeigten ein vollständiges zytogenetisches Ansprechen (*complete cytogenetic response*, CCyR) mit einem Gesamtüberleben von 83,3% nach 10 Jahren (Hochhaus et al. 2017).

Bei Nichtansprechen oder Wirkungsverlust der Therapie stehen weiterhin der Wechsel zu einem TKI der zweiten (z.B. Nilotinib, Dasatinib) oder dritten Generation (z.B. Ponatinib) sowie die allogene Stammzelltransplantation zur Verfügung.

In Studien wurde die Effizienz der Imatinib-Therapie bei Kindern im French National Phase IV Trial mit der bei Erwachsenen verglichen (Milot et al. 2011). Das frühe molekulare Ansprechen, gekennzeichnet durch einen *BCR-ABL1*-Spiegel von  $\leq 10\%$  nach dreimonatiger Imatinib-Therapie, ist für die Prognose bedeutend. Jedoch verfehlten in einer Studie von Milot et al. mehr Kinder (37%) als Erwachsene (24-28%) diesen Grenzwert (Milot et al. 2014a). Eine andere Studie zeigte ein schlechteres Ansprechen der jüngeren Altersgruppe (15- bis 29-Jährige) gegenüber älteren Patienten (Pemmaraju et al. 2012). Ein weiterer Prognosefaktor ist das Alter der Kinder bei Diagnose, so haben 1- bis 4-jährige CML-Patienten die schlechteste Prognose (Wang et al. 2016).

Für Imatinib sind Nebenwirkungen wie der gestörte Knochenstoffwechsel und veränderte Werte für die Knochendichte bekannt (Vandyke et al. 2010, Vandyke et al. 2013). Dies kann bei Kindern zu Wachstumsstörungen führen (Milot et al. 2014b).

Einige Studien legen nahe, dass die „Wachstumshormon-*Insulin-like-growth-factor-1*-(*IGF1*)-Achse“ gestört wird (Ulmer et al. 2013, Narayanan et al. 2013). Da Imatinib zudem teratogen wirken kann, sollten junge Frauen im gebärfähigen Alter eine Schwangerschaft

unter der Therapie vermeiden (Pye et al. 2008). Insgesamt scheinen CML-Patienten im Kindes- und Adoleszentenalter auf die Imatinib-Therapie schlechter anzusprechen als Erwachsene. Sie leiden häufiger unter Nebenwirkungen und nicht zuletzt können sie aufgrund ihrer längeren Lebenserwartung über Jahrzehnte der Therapie ausgesetzt sein. Deshalb ist der aus der Erwachsenenmedizin aktuell verfolgte Ansatz, Imatinib nach Erreichen eines dauerhaften tiefen molekularen Ansprechens abzusetzen, gerade auch für pädiatrische CML-Patienten von großem Interesse. Dies könnte möglicherweise eine Heilung ohne Stammzelltransplantation bedeuten. In laufenden Studien in Erwachsenen wird untersucht, ob bei vollständigem Verschwinden des *BCR-ABL1*-Transkripts der Patient als geheilt angesehen und der TKI sicher abgesetzt werden kann (Mahon et al. 2010). Interferon kann die Remission nach Imatinib-Therapie aufrecht erhalten, jedoch erlitten in einer Studie von Burchert et al. 25% der mit Imatinib und Interferon vorbehandelten CML-Patienten ein Rezidiv (Burchert et al. 2010).

Schließlich ist ein weiteres Problem der TKI-Therapie, dass Langzeitwirkungen aufgrund des noch kurzen Zeitraums seit der Medikamentenzulassung bisher nicht untersucht werden konnten. Weitere Studien zu Krankheitsverläufen sind notwendig, um die Therapie an die besonderen Bedürfnisse der CML-Patienten im Kindes- und Adoleszentenalter anzupassen. Die Forschung zur Krankheitsentstehung auf molekularer Ebene kann zu einem besseren Verständnis der Pathogenese führen. Möglicherweise können so molekulargenetische Erkenntnisse auf neue Therapieansätze übertragen werden und die Therapie der CML im Kindesalter optimiert werden.

### 1.3 Molekulargenetische Aspekte

Die klinischen Unterschiede legen den Verdacht auf unterschiedliche Biologien der CML im Kindes- und Erwachsenenalter nahe.

Bezüglich des Philadelphia-Chromosoms konnten Krumbholz et al. feststellen, dass sich die Bruchpunktverteilung im *BCR*-Gen bei CML-Patienten im Kindesalter von der im Erwachsenenalter unterscheidet. Außerdem fanden sich die Bruchpunkte öfter innerhalb der *Alu* repeat-Regionen (Krumbholz et al. 2012). *Alu* RNA hemmt nach neueren Erkenntnissen die Transkription während der zellulären Hitzeschockantwort (Mariner et al. 2008). Dieses Bruchpunktmuster ähnelt der Verteilung wie sie bei der Ph-positiven akuten lymphatischen

Leukämie festgestellt wurde (Krumbholz et al. 2012). Die gefundenen Unterschiede auf genetischer Ebene könnten die höhere Aggressivität der CML im Kindesalter mitbegründen. Von diesen Ergebnissen und den unterschiedlichen Inzidenzen der CML im Kindes- und Erwachsenenalter ausgehend kann man die Hypothese aufstellen, dass auch verschiedene Mechanismen zum Chromosomenbruch und damit zum Philadelphia-Chromosom führen. Die der *BCR-ABL1*-Translokation folgenden veränderten biochemischen Vorgänge und die damit verbundene Verdrängung der normalen Hämatopoese durch Proliferation sind hinreichend bekannt. Jedoch ist bis heute unklar, warum die Translokation überhaupt entsteht. Unter dem ätiologischen Gesichtspunkt werden Benzol und ionisierende Strahlung als gesicherte Risikofaktoren anerkannt (Jin et al. 2016). Die Suche nach weiteren Faktoren ist Gegenstand der Forschung. Auf molekulargenetischer Ebene gibt es die Hypothese einer Mehrschrittpathogenese. Diese basiert auf verschiedenen Beobachtungen. Nach aktuellem Forschungsstand wird davon ausgegangen, dass in CML-Patienten eine residuelle Ph-negative Hämatopoese in Koexistenz mit dem malignen Klon vorliegt. Diese Annahme fußt auf Untersuchungen, bei denen aus CML-Patienten über längere Krankheitsverläufe Ph-negative Progenitorzellen gewonnen werden konnten (Carella et al. 1993). Im Gegensatz dazu gibt es Hinweise darauf, dass die *BCR-ABL1*-Translokation in einer bereits vorhandenen klonalen Population stattfindet. Mit dem Ziel, die Beziehung zwischen Philadelphia-Chromosom und CML-Pathogenese zu untersuchen, haben Fialkow et al. Klonalitätsanalysen mit Epstein-Barr-Virus transformierten Ph-negativen B-Lymphozyten von CML-Patienten durchgeführt. Diese zeigten eine Verschiebung des Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Isoenzyms in Richtung des CML-Klons (Fialkow et al. 1981). Eine solche Beobachtung deutet darauf hin, dass die Entstehung des Philadelphia-Chromosoms nicht die alleinige Ursache für die Pathogenese der CML ist. Im Rahmen der Mehrschrittpathogenese könnte der *BCR-ABL1*-Translokation ein „prä-*BCR-ABL1*-Ereignis“ vorausgehen. Für die Hypothese eines klonalen Vorstadiums der CML spricht außerdem, dass auch bei Gesunden eine geringe Menge an *BCR-ABL1* mRNA nachgewiesen werden kann (Biernaux et al. 1995, Bose et al. 1998).

Ein solches „prä-*BCR-ABL1*-Ereignis“ könnte zum Beispiel eine Mutation in einem epigenetischen Regulatorgen sein. Bei der Suche nach dementsprechenden Mutationen konnten in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe erstmals neue Mutationen in *BCR-ABL1*-unabhängigen Genen detektiert werden (Schmidt et al. 2014). Hierzu wurde in der Arbeitsgruppe eine Methode etabliert, die auf dem NGS basiert. Mit dem sogenannten „Jena-Leukämie-Panel“ ist eine sensitive und simultane Analyse der 25 am häufigsten mutierten

und mit Leukämie assoziierten Gene möglich (Rinke et al. 2013). Es wurden Gene aus den Bereichen der Signaltransduktion (*FLT3*, *JAK2*, *NRAS*, *KRAS*, *BRAF*, *CBL*, *MPL*, *KIT*, *LNK*), der Transkriptionsfaktoren (*NPM1*, *RUNX1*, *WT1*, *TP53*, *ETV6*), der Epigenetik (*EZH2*, *UTX*, *ASXL1*, *DNMT3A*, *TET2*, *IDH1*, *IDH2*) sowie aus dem RNA-Splicing-Komplex (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF35*, *ZRSR2*) eingeschlossen. Um Erkenntnisse über die klonale Entstehung der CML zu gewinnen, wurden sowohl Ph-positive als auch Ph-negative Zellklone von CML-Patienten im Stadium der chronischen Phase untersucht. In die Kohorte der Ph-negativen Zellklone wurden CML-Patienten aufgenommen, die unter TKI-Therapie klonale zytogenetische Anomalien (*clonal cytogenetic abnormalities*, CCA) entwickelten. Die CCA weisen darauf hin, dass auch die Ph-negative Hämatopoese gestört verläuft. Hier konnten bei sechs von 14 Patienten (43%) sieben verschiedene Mutationen gefunden werden. Diese betrafen die Gene *DNMT3A*, *EZH2*, *RUNX1*, *TET2*, *TP53*, *U2AF35* und *ZRSR2*. Ph-positive Zellklone wurden an CML-Patienten bei Erstdiagnose untersucht. Hier fanden sich in fünf von 15 Patienten (33%) sechs verschiedene Mutationen in den Genen *ASXL1*, *DNMT3A*, *RUNX1* und *TET2*. Die Mutationen waren nicht in konstitutioneller, aus Mundabstrichen gewonnener DNA nachweisbar, was ihren somatischen Ursprung beweist. Mithilfe von Kolonie-Stammzellanalysen von drei Patienten konnte bestätigt werden, dass die identifizierten Mutationen auf den gleichen Klonen lagen wie die *BCR-ABL1*-Translokation. In Verlaufsprüben nach dreimonatiger Nilotinib-Therapie zeigten sich in Ph-negativen Zellen bis auf eine *DNMT3A*-Mutation bei einem Patienten keine Mutationen mehr. Diese *DNMT3A*-Mutation konnte jedoch selbst nach 24 Monaten Nilotinib-Therapie und Erreichen einer tiefen molekularen Remission in Ph-negativen Zellen mit geringerem Anteil nachgewiesen werden. Aus diesen Beobachtungen kann abgeleitet werden, dass es sich bei der *DNMT3A*-Mutation möglicherweise um ein „prä-*BCR-ABL1*-Ereignis“ in einem präexistenten Klon handelte, das der *BCR-ABL1*-Translokation vorausging. Somit unterstützen die Ergebnisse die Hypothese einer Mehrschrittpathogenese.

Aus den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe kann die Hypothese für die vorliegende Arbeit abgeleitet werden. Diese lautet, dass analog zu den Erwachsenen auch bei der CML im Kindes- und Adoleszentenalter *BCR-ABL1*-unabhängige Zusatzmutationen auftreten und für die Entstehung, Progression und Therapie der Erkrankung eine wichtige Rolle spielen könnten.



## 2 Ziele der Arbeit

Zwischen der CML im Erwachsenenalter und der CML im Kindesalter wurden zahlreiche Unterschiede festgestellt, die vor allem Inzidenz, klinische Verläufe und Therapieansprechen betreffen. Jedoch konnten auch auf molekularbiologischer Ebene Unterschiede beobachtet werden. Der Biologie und Pathogenese der CML im Kindesalter könnten andere Zusammenhänge zugrunde liegen als der CML im Erwachsenenalter. Somit kann die CML im Kindesalter nicht analog zur CML im Erwachsenenalter betrachtet werden. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Ernst konnten durch den Nachweis von häufigen *BCR-ABL1*-unabhängigen Zusatzmutationen in erwachsenen CML-Patienten neue Erkenntnisse zur Pathogenese der CML gewonnen werden. Es stellt sich die Frage, ob solche Mutationen auch bei CML-Patienten im Kindesalter und in jungen Erwachsenen auftreten, und wenn ja, welche Gene sie betreffen. Um eine Antwort auf diese Frage zu finden, war das Ziel dieser Arbeit die Untersuchung von Prävalenz, Kinetik und prognostischer Bedeutung *BCR-ABL1*-unabhängiger Zusatzmutationen bei CML-Patienten im Kindesalter.

Dazu wurden folgende Schwerpunkte gelegt:

1. Untersuchung der Prävalenz *BCR-ABL1*-unabhängiger Mutationen bei CML-Patienten im Kindesalter mittels NGS
2. Verifizierung des somatischen Ursprungs der detektierten Mutationen durch Analyse von Wangenabstrich-DNA
3. Klonalitätsuntersuchungen mithilfe des Kolonie-Stammzell-Assays zur Untersuchung der klonalen Hierarchie
4. Untersuchung der Mutationskinetik unter TKI-Therapie
5. Untersuchung der prognostischen Bedeutung *BCR-ABL1*-unabhängiger Mutationen

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Patientenmaterial

Die Patientenkohorte umfasste 21 CML-Patienten im Kindes- und jungen Erwachsenenalter, die in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Jena in den Jahren 1988 bis 2013 behandelt wurden. Das Probenmaterial wurde von Herrn Prof. Dr. med. Bernd Gruhn zur Verfügung gestellt. Knochenmarkproben zum Diagnosezeitpunkt wurden aufgearbeitet um im Folgenden DNA aus Leukozyten zu gewinnen. Außerdem konnten von drei Patienten (#3, #5, #13) Mundabstriche (MA) gewonnen werden. Von einem Patienten (#9) waren zudem kryokonservierte MNC zum Diagnosezeitpunkt vorhanden.

Insgesamt beinhaltete die Patientenkohorte sechs Mädchen und 15 Jungen. Die Patienten wiesen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose die *BCR-ABL1*-Translokation auf und waren im Median 14 Jahre alt (Bereich: 10 Monate bis 27 Jahre).

Für die Verlaufskontrolle von Patient #3 waren Daten zum molekularen Ansprechen (*BCR-ABL1*-Transkripte) und zum Vorliegen *BCR-ABL1*-unabhängiger Mutationen bis zu 36 Monate nach Therapiebeginn mit TKI verfügbar.

In Tabelle 1 werden die klinischen Daten der Patienten aus der verwendeten Kohorte dargestellt.

Tabelle 1: Patientenkohorte

Pat. Nr.	Pr. Nr.	Geschl.	Alter bei ED	Jahr der ED	Zytogenetik	Molekular-genetik	Therapie	allo SCT	ÜL	ÜL in Mon.
#1	11-154	m	15	2011	46,XY,t(9;22)(q34;q11),-18,+mar[cp9]; 46,XY,(9;22)(q34;q11) [11]	b3a2	Imatinib	nein	ja	83
#2	12-329	m	10	2012	46,XY,t(9;22)(q34;q11)	b3a2	Imatinib	nein	ja	70
#3	12-615	m	24	2012	46,XY,t(9;22)(q34;q11),t(12;15)(p13;q24) [19]; 1 MPP t(9;22) und t(12;15)	b2a2	Nilotinib, Interferon	nein	ja	74
#4	103	m	14	1996	46,XY,t(9;22)(q34;q11)	M-BCR-ABL	Hydroxyurea, Interferon	ja	nein	16
#5	104	m	14	1993	46,XY,t(9;22)(q34;q11)	k. A.	Busulfan, Hydroxyurea	ja	ja	297
#6	105	m	0	1999	k. A.	BCR-ABL- positiv	k. A.	ja	nein	7
#7	106	m	23	1993	k. A.	M-BCR-ABL	Hydroxyurea	ja	ja	293
#8	107	m	15	1997	Ph-positiv	b2a2	Hydroxyurea, Interferon	ja	nein	14
#9	108	w	13	1997	46,XX,t(9;22)(q34;q11); MPP mit 46,XX,t(9;22),i(17)(q10)	M-BCR-ABL	Hydroxyurea	ja	nein	14
#10	109	w	13	1995	Ph-positiv	BCR-ABL-	Hydroxyurea,	ja	nein	15

Pat. Nr.	Pr. Nr.	Geschl.	Alter bei ED	Jahr der ED	Zytogenetik	Molekular-genetik	Therapie	allo SCT	ÜL	ÜL in Mon.
						positiv	Interferon			
#11	110	w	11	1999	46,XX,t(9;22)(q34;q11)	M-BCR-ABL	Hydroxyurea	ja	nein	8
#12	111	w	11	2001	46,XX,t(9;22)(q34;q11); BCR/ABL-positiv (FISH)	k. A.	Hydroxyurea	ja	ja	195
#13	112	w	14	1997	46,XX,t(9;22)(q34;q11)	M-BCR-ABL	Hydroxyurea, Interferon	ja	ja	249
#14	188	m	15	2003	46,XY,t(9;22)(q34;q11)	M-BCR-ABL	Hydroxyurea	ja	ja	180
#15	190	m	7	2003	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)	b2a2	Hydroxyurea, Imatinib	ja	ja	177
#16	259	m	14	1995	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)	M-BCR-ABL	Hydroxyurea	ja	nein	7
#17	391	m	15	1988	Ph-positiv	k. A.	Myelobromol, Merkaleukin	ja	nein	11
#18	398	m	20	1989	Ph-positiv	k. A.	k. A.	ja	nein	50
#19	402	w	5	1989	46,XX,t(5;9;22)(q13;q34;q11)	k. A.	Busulfan	ja	ja	344
#20	405	m	27	1989	Ph-positiv	k. A.	Hydroxyurea, Interferon	ja	nein	34
#21	332561 15	m	23	2013	46,XY,t(9;22)(q34;q11) [23]; 46,XY [2]	b2a2	Nilotinib, Interferon	nein	ja	60

Pat. Nr.	Pr. Nr.	Geschl.	Alter bei ED	Jahr der ED	Zytogenetik	Molekular- genetik	Therapie	allo SCT	ÜL	ÜL in Mon.
<b>Abkürzungen:</b> allo SCT, allogene Stammzelltransplantation; ED, Erstdiagnose; k. A., keine Angabe; m, männlich; Mon., Monate; M-BCR-ABL, major breakpoint cluster region; MPP, Metaphaseplatten; Pat. Nr., Patientennummer; Ph, Philadelphia-Chromosom; Pr. Nr., Probennummer; ÜL, Überleben; w, weiblich.										

### 3.1.2 Chemikalien

Die in Tabelle 2 aufgelisteten Chemikalien wurden für die in dieser Arbeit beschriebenen Methoden verwendet.

**Tabelle 2: Chemikalien mit Hersteller**

Chemikalien	Hersteller
Agarose	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ampuwa	Fresenius Kabi GmbH (Bad Homburg, Deutschland)
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
DNA Längenstandard (100 bp)	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
DNase I	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
EDTA	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ethanol, 96%	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ethidiumbromid	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Exonuclease I	New England Biolabs (Ipswich, UK)
FBS	Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
Glycerin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
IMDM	Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
Kaliumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Na <sub>2</sub> -EDTA	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
NaOH pellets®	Roth (Karlsruhe Deutschland)
PBS	Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
SAP	Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland)
SDS	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Tris-HCl	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Tween® 20	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
2-Propanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
<b>Abkürzungen:</b> bp, Basenpaare; EDTA, Ethylendiamintetraacetat; FBS, <i>Fetal Bovine Serum</i> ; HCl, Salzsäure; IMDM, <i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i> ; PBS, <i>Phosphate buffered saline</i> ; SAP, <i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i> ; SDS, Natriumdodecylsulfat.	

### 3.1.3 Lösungen

#### Erythrozyten-Lysepuffer [10x]

Für die Herstellung des 10x Erythrozyten-Lysepuffers wurden 41,5 g Ammoniumchlorid, 5 g Kaliumhydrogencarbonat und 0,175 g EDTA-Lösung mit 500 ml Aquadest aufgefüllt.

**Ladepuffer**

Um den Ladepuffer für die Gelelektrophorese herzustellen wurde 1 ml einer 1 molaren Stammlösung Tris-HCL pH 8 [10mM] mit 200 µl einer 0,5 molaren Stammlösung Na<sub>2</sub>-EDTA [0,5M], 500 µl einer 20%igen Stammlösung SDS [1%], 30 ml Glycerin [30%] und 62,5 µl einer 4%igen Stammlösung Bromphenolblau [0,0025%] versetzt und mit Aquadest auf 100 ml aufgefüllt.

**TAE-Puffer [50x]:**

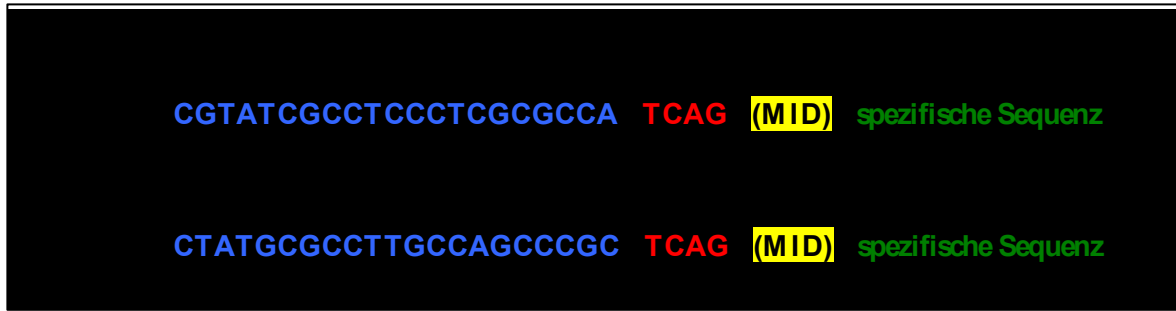
Für die Herstellung des TAE-Puffers wurden 242 g Tris Base in 57,1 ml Essigsäure und 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8) gelöst und mit Aquadest auf 1000 ml aufgefüllt.

**TE-Puffer:**

Der TE-Puffer wurde angesetzt, indem 1 ml 1M Tris-HCl (pH8,0) mit 0,2 ml 0,5M EDTA (pH 8,0) vermennt und mit Auquadest auf 100 ml aufgefüllt wurde.

**3.1.4 Primer**

Die Primer für die Herstellung aller 231 Amplicons wurden in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe entsprechend der Herstellerangaben des 454 GS Junior Sequenzierers (Roche) entworfen. Die verwendeten Primer sind im Primerverzeichnis im Anhang aufgeführt. Sie kodieren für Exons, Intron/Exon-Grenzen oder Hotspots von insgesamt 30 Genen. Alle Primer bestehen aus drei unterschiedlichen Anteilen: dem Fusionsprimer, der Sequenz TCAG und der für den jeweiligen Genabschnitt spezifischen Sequenz. Der Fusionsprimer ist für die 454-Sequenzierung notwendig, da er während verschiedener Schritte der Methode (z.B. Aufreinigung) als Adapter fungiert (Abb.1 in blau). Durch die TCAG-Sequenz können mit DNA besetzte Beads während der Sequenzierung vom Gerät erkannt werden (Abb.1 in rot). Die in der Abbildung grün markierte Sequenz entspricht der zu amplifizierenden Zielregion und ist komplementär zur genomischen DNA. Für die Herstellung der *JAK2*-Sensitivitätskontrollen wurden *multiplex identifier*-Primer (MID) (Abb.1 in gelb) eingefügt, die als molekulare Barcodes zur Unterscheidung der Fragmente dienen.



**Abbildung 1: Sequenz der Forward und Reverse Primer zur Herstellung der Amplicons** [modifiziert nach Amplicon Library Preparation Method Manual, Roche, 2010]

### 3.1.5 Kits

Die im Rahmen der labortechnischen Methoden genutzten Kits sind in Tabelle 3 aufgelistet.

**Tabelle 3: Kits mit Hersteller**

Name des Kits	Hersteller
Agencourt <sup>®</sup> AMPure <sup>®</sup> XP	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
BigDye <sup>®</sup> Terminator v1.1 - Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Waltham, Massachusetts, USA)
Fast Start High Fidelity PCR System	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
GC-rich PCR System	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
GS Junior Titanium emPCR Kit	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
GS Junior Titanium Sequencing Kit	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
GS Junior PicoTiterPlate Kit	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
One Shot TOP 10F <sup>+</sup> Chemically Competent E. coli	life technologies <sup>™</sup> (Darmstadt, Deutschland)
PicoPLEX <sup>™</sup> WGA Kit	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Pyromark Q96ID Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Quant-iT <sup>™</sup> PicoGreen <sup>®</sup> dsDNA Assay Kit	life technologies <sup>™</sup> (Darmstadt, Deutschland)
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Repli-g UltraFast Mini Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
XTerminator <sup>™</sup> Solution	Applied Biosystems (Waltham, Massachusetts, USA)



### 3.1.6 Geräte

Tabelle 4 zeigt eine Auflistung aller für die Durchführung der Methoden genutzten Geräte und deren Hersteller.

**Tabelle 4: Geräte mit Hersteller**

Gerät	Hersteller
ABI 3500 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, (Waltham, Massachusetts, USA)
Clariostar Plattenreader	BMG Labtech (Ortenberg, Deutschland)
Coulter Z2	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
Eppendorf centrifuge 5415 D	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eppendorf centrifuge 5415 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eppendorf centrifuge 5430	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eppendorf mastercycler gradient	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eppendorf Mix Mate	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Infinite1000	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Lab rotator SB2	Stuart <sup>®</sup> (Staffordshire, Großbritannien)
Geldokumentationssystem	Intas Science Imaging (Göttingen, Deutschland)
Gelkammer MultiSUB Midi	Cleaver Scientific (Rugby, Großbritannien)
Power Pac Basic Power Supply	Bio Rad (Hercules, Kalifornien, USA)
Rotofix 32	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Deutschland)
Nanodrop ND 2000	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Ultra Turrax X <sup>®</sup> Tube Drive	IKA <sup>®</sup> (Staufen, Deutschland)
Vakuumpumpe Laboport	KNF Neuberger (Freiburg, Deutschland)
Vortex Genie <sup>®</sup>	Scientific Industries (New York, USA)
454 GS Junior Sequenzierer	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)

### 3.1.7 Software

- Intas Software (*GEL iX20 Imager*, Intas)
- GS Amplicon Variant Analyzer (Version 2.7, Roche)
- Mutation Surveyor (Version 5.0, Soft Genetics)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 DNA-Isolation

Für diese Arbeit wurde das Patientenmaterial in Form von Leukozytenpellets zur Verfügung gestellt, aus denen mittels QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) DNA isoliert wurde. Zusätzlich wurde bei drei Patienten die DNA aus Mundabstrichen gewonnen.

#### 3.2.1.1 DNA-Isolation aus Leukozyten

Die Leukozytenpellets wurden auf Eis aufgetaut. Um bessere Ergebnisse zu erzielen wurde das Pellet mithilfe von Spritze und Nadel resuspendiert. Die Schritte der DNA-Isolation entsprechen dem Protokoll des QIAamp DNA Mini Kit.

#### 3.2.1.2 DNA-Isolation aus Mundspeichel

Es wurden von drei Patienten Abstriche der Mundschleimhaut genommen, die bei -20°C gelagert wurden. Für die DNA-Isolation wurde das QIAamp DNA Mini Kit mit modifiziertem Protokoll genutzt. Zuerst wurden 20 µl Protease in ein 1,5 ml Mikrozentrifugationsröhrchen pipettiert. Es wurden 200 µl PBS sowie der steril vom Stiel abgetrennte Wattetupfer hinzugefügt und am Vortexgerät gemischt. Der Zugabe von 200 µl AL Puffer folgte ein 15-sekündiges Impulsmischen am Vortexgerät. Nach einer 10-minütigen Inkubation im 56°C heißen Wasserbad wurde der Wattetupfer aus dem Röhrchen entfernt. Die folgenden Schritte sind mit denen der DNA-Isolation aus Leukozyten entsprechend des Protokolls identisch. Lediglich im letzten Schritt wurde die DNA bei einer Inkubationszeit von 5 Minuten in nur 25 µl AE-Puffer eluiert.

### 3.2.2 Konzentrationsmessung

Zuletzt wurde am Nanodrop (Thermo Scientific) die DNA-Konzentration ermittelt. So konnte sowohl der Erfolg der DNA-Isolation aus Leukozytenpellets bzw. Mundspeichel überprüft werden als auch ein Messwert als Ausgangswert für die anschließende Verdünnung erstellt werden. Der Nanodrop ist ein Spektrophotometer, das durch das Messen des für eine Substanz spezifischen Absorptionsvermögens für Licht bei einer bestimmten Wellenlänge die Konzentration eines gelösten Stoffes ermittelt. Die auf DNA bezogene Wellenlänge beträgt 260 nm.

Vor der Messung wurde das Detektionspult mit Wasser gereinigt und zur Erstellung eines Hintergrundwertes wurde 1 µl TAE-Puffer aufgetragen und gemessen. Anschließend wurde 1 µl gelöste DNA eingesetzt um die DNA-Menge zu ermitteln.

### **3.2.3 Whole Genome Amplification**

Die Menge des Ausgangsmaterials für molekulare Analysen ist oft limitiert. Daher optimierte die Arbeitsgruppe in Vorarbeiten die Sequenzierung mittels NGS im Hinblick auf eine geringe DNA-Menge (Rinke et al. 2013). So kann das NGS auch mit amplifizierter DNA durchgeführt werden. Für diese Arbeit wurde die begrenzte DNA-Menge mithilfe des Repli-g UltraFast Mini Kits (Qiagen) amplifiziert und so eine angemessene Ausgangsmenge hergestellt. Die einzelnen Arbeitsschritte entsprachen dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll. Dieses ist für die Amplifikation einer Ausgangsmenge von >10 ng DNA optimiert. In vorliegender Arbeit wurde jeweils 1 µl DNA mit einer Konzentration von 20 ng/µl eingesetzt. Um eine Kontamination auszuschließen wurde eine zusätzliche Amplifikation mit 1 µl Ampuwa als Kontrolle durchgeführt. Die amplifizierten Proben wurden mit Ampuwa verdünnt um eine Konzentration von ungefähr 20 ng/µl zu erreichen und konnten bei -20°C gelagert werden.

### **3.2.4 Auswahl der Gene**

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurden die 25 häufigsten mutierten Gene in Assoziation mit akuter myeloischer Leukämie (AML), myelodysplastischem Syndrom (MDS), MPN und MDS/MPN mittels NGS auf Mutationen an bekannten Hotspots untersucht (Rinke et al. 2013). In weiterführenden Arbeiten der Forschungsgruppe wurde das Jena-Leukämie-Panel nach aktuellen Erkenntnissen auf 30 Gene erweitert (Schafer et al. 2016). Alle untersuchten Gene mit dazugehörigen Exons sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Ausgewählte Gene

Gruppe	Gen	Exon
Signaltransduktion	<i>BRAF</i>	11,15
	<i>CBL</i>	8, 9
	<i>CSF3R</i>	14, 17
	<i>FLT3</i>	20
	<i>JAK2</i>	12, 14
	<i>KIT</i>	8, 17
	<i>KRAS</i>	2, 3
	<i>LNK</i>	2
	<i>MPL</i>	10
	<i>NOTCH1</i>	25 – 34
	<i>NRAS</i>	2, 3
	<i>SETBP1</i>	4
Transkriptionsfaktoren	<i>CALR</i>	9
	<i>ETV6</i>	1 – 8
	<i>NPM1</i>	12
	<i>RUNX1</i>	3 – 8
	<i>TP53</i>	2 – 11
	<i>WT1</i>	7, 9
Epigenetik	<i>ASXL1</i>	12
	<i>DNMT3A</i>	2 – 23
	<i>EZH2</i>	2 – 20
	<i>IDH1</i>	4
	<i>IDH2</i>	4
	<i>TET2</i>	3 – 11
	<i>UTX</i>	1 – 29
RNA-Splicing	<i>SF3B1</i>	12 – 16
	<i>SRSF2</i>	1, 2
	<i>U2AF35</i>	2, 6
	<i>ZRSR2</i>	1 – 11
Cohesin Complex	<i>STAG2</i>	3 – 34

**Abkürzungen:** *ASXL1*, Additional sex combs like 1; *BRAF*, B-Raf proto-oncogene; *CALR*, Calreticulin; *CBL*, Casitas B lineage lymphoma proto-oncogene; *CSF3R*, Colony stimulating factor 3 receptor; *DNMT3A*, DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha; *ETV6*, ETS variant 1; *EZH2*, Enhancer of zeste homologe 2; *FLT3*, Fms related tyrosine kinase 3; *IDH1*, Isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 1, cytosolic; *IDH2*, Isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 2, mitochondrial; *JAK2*, Janus kinase 2; *KIT*, KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase; *KRAS*, v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; *LNK*, Lymphocyte specific adapter protein lmk; *MPL*, MPL proto-oncogene, thrombopoietin receptor; *NOTCH1*, Notch homolog 1; *NPM1*, Nucleophosmin; *NRAS*, Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog; *RUNX1*, Runt related transcription factor 1; *SETBP1*, SET binding protein 1; *SF3B1*, Splicing factor 3b subunit 1; *SRSF2*, Serine/arginine-rich splicing factor 2; *STAG2*, Stromal antigen 2; *TET2*, Tet methylcytosine dioxygenase 2; *TP53*, Tumor protein P53; *U2AF35*, U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1; *UTX*, Lysine (K)-specific demethylase 6A; *WT1*, Wilms tumor 1; *ZRSR2*, Zinc finger CCCH-type, RNA binding motif and serine/arginine rich 2.

Um die Gesamtzahl der ausgewählten Genabschnitte abzudecken mussten für jeden Patienten 231 PCR-Amplicons generiert werden. Diese weisen eine Länge von 300 bis 400 Basenpaaren (bp) zuzüglich der Adaptersequenzen von 50 bp auf. Primer wurden entworfen, um überlappende Anteile der zu amplifizierenden Genabschnitte abzudecken. Dadurch konnten Exons komplett erfasst und Mutationen der Spleißstellen mit einbezogen werden.

### 3.2.5 Polymerasekettenreaktion

Die ausgewählten Genabschnitte wurden mittels *polymerase chain reaction* (PCR) amplifiziert. Für Fast Start Amplicons wurde das High Fidelity Fast Start Kit (Roche) benutzt und eine DNA-Menge von 1 µl eingesetzt. Für GC-reiche Amplicons wurde unter Einsatz von 2 µl DNA das GCrich dNTP Kit (Roche) verwendet. Bei beiden Reaktionen betrug die DNA-Konzentration ca. 20ng/µl. Die entsprechenden Primer sind dem Primerverzeichnis im Anhang zu entnehmen. Alle PCRs wurden auf Eis angesetzt. Bei jeder Reaktion konnte durch Negativkontrollen eine Kontamination ausgeschlossen werden. Die Zusammensetzung des Master Mixes sowie die Programmabläufe sind den Tabellen 6 - 9 zu entnehmen.

**Tabelle 6: Protokoll für Fast Start High Fidelity PCR**

Reagenz	Konzentration	Volumen [µl]
Molecular Biology Grade Water		17,75
Fast Start Buffer	[10x]	2,5
dNTP Mix	[10 mM]	0,5
Forward Primer	[6,7 µM]	1,5
Reverse Primer	[6,7 µM]	1,5
Fast Start High Fidelity Polymerase	[5 U/µl]	0,25
DNA RepliG	[20 ng/µl]	1
<b>Gesamt</b>		<b>25</b>

**Tabelle 7: Programmablauf für Fast Start High Fidelity PCR**

	Temperatur	Dauer [min]	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	10	1
Denaturierung	94°C	1	35
Annealing	64°C	1	
Elongation	72°C	1	
Finale Elongation	72°C	10	1
Kühlung	4°C	nicht begrenzt	1

Tabelle 8: Protokoll für GCrich PCR

Reagenz	Konzentration	Volumen [ $\mu$ l]	Volumen [ $\mu$ l]
<b>Master Mix 1</b>		<b>0,5 M Resolution Solution</b>	<b>1 M Resolution Solution</b>
Molecular Biology Grade Water		9,5	7
dNTP	[10 mM]	0,5	0,5
Forward Primer	[10 $\mu$ M]	1,5	1,5
Reverse Primer	[10 $\mu$ M]	1,5	1,5
DNA RepliG	[20 ng/ $\mu$ l]	2	2
Resolution Solution	[5 M]	2,5	5
<b>Master Mix 2</b>			
Molecular Biology Grade Water		2	2
5x Reaction Buffer mit DMSO		5	5
Enzym Mix		0,5	0,5
<b>Gesamt</b>		<b>25</b>	<b>25</b>

Tabelle 9: Programmablauf für GCrich PCR

	Temperatur	Dauer [min]	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	10	1
Denaturierung	94°C	1	45
Annealing	60°C	1	
Elongation	72°C	1	
Finale Elongation	72°C	10	1
Kühlung	4°C	nicht begrenzt	1

### 3.2.6 JAK2-Sensitivitätskontrollen

Um die Sensitivität der NGS-Methode zu kontrollieren wurden acht Plasmidkontrollen mit unterschiedlichen Anteilen der Mutation *JAK2* V617F generiert (0,1%, 0,5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 50%, 100%), die bei den einzelnen Läufen ebenfalls sequenziert wurden. Zur Herstellung wurden unter Verwendung des TOPO TA Cloning Kits mit dem One Shot TOP 10F' Chemically Competent *E. coli* Kit (life technologies) Wildtyp- und mutante Allele kloniert. Anschließend erfolgte die Plasmid-Isolation mithilfe des Plasmid Maxi Kits (Qiagen). Um die gewünschte Konzentration zu bestätigen wurden alle Kontrollen mittels Pyrosequenzierung mit dem Pyromark Q96ID Kit (Qiagen) und mittels Genotypisierung mit der Amplification Refractory Mutation System (ARMS) PCR analysiert (Jones et al. 2005, Rinke et al. 2013) und schließlich dem zu sequenzierenden Amplicon-Pool der Probe hinzugefügt.

### 3.2.7 Gelelektrophorese

Mit der Gelelektrophorese konnte das Ergebnis der PCR überprüft werden. Zur Herstellung des Gels wurden 4,5 g Agarose in 150 ml TAE-Puffer unter Erwärmung in der Mikrowelle (4 Minuten bei 900 Watt) aufgelöst und anschließend unter ständigem Schwenken auf ca. 60 °C abgekühlt. Danach wurden 3 µl Ethidiumbromid hinzugefügt und durch Schwenken gleichmäßig in dem Gemisch verteilt. Die Agarosegellösung wurde in einen dafür vorgesehenen Gelschlitten gegossen, anschließend wurde ein Kamm für 96 Taschen eingesetzt. Nachdem das Gel bei Raumtemperatur erstarrt war, konnte es in die Gelkammer gesetzt werden. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer bis zur vollständigen Bedeckung des Gels in die Kammer gefüllt. Es wurden 2,5 µl PCR-Produkt mit 5 µl Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen überführt. Zum Vergleich der DNA-Banden wurden jeweils 2,5 µl Längenstandard mit 100 bp in die seitlichen Geltaschen gegeben. Nachdem das Gel 20 Minuten lang einer Spannung von 120 Volt ausgesetzt war, konnten die DNA-Banden im Geldokumentationssystem visualisiert und mithilfe der Intas Software (*GEL iX20 Imager*, Intas) beurteilt werden.

### 3.2.8 Next Generation Sequencing (NGS)

Das NGS wurde auf der 454 GS Junior Plattform von Roche durchgeführt. Dabei wurden für die Sequenzierung, wie in den Angaben des Herstellers empfohlen, die GS Junior Titanium Chemistry Kits (Roche) eingesetzt. Als Ausgangsmaterial dienten pro Patient 231 PCR-Amplicons, hergestellt entsprechend den oben genannten PCR-Protokollen (siehe 3.2.4). Die Aufreinigung der PCR-Produkte mit dem Agencourt AMPure XP Kit (Beckmann Coulter) diente dazu, Primer, Salze und andere Rückstände der PCR herauszuwaschen. Im letzten Schritt wurden die Amplicons in 20 - 30 µl TE-Puffer eluiert. Mithilfe der Quantifizierung mit dem Quant-iT<sup>TM</sup> PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Invitrogen) konnten die exakten Konzentrationen der einzelnen PCR-Produkte ermittelt werden. Danach wurden alle Amplicons auf eine Konzentration von 10<sup>9</sup> DNA-Molekülen pro 1 µl verdünnt. Die einzelnen Amplicons wurden entsprechend der Angaben im Primerverzeichnis zusammengeführt (Pool). Die *JAK2* - Sensitivitätskontrollen wurden in 1,5facher Menge zugegeben. Anschließend wurde der Pool entsprechend den Herstellerangaben des Agencourt AMPure XP Kits aufgereinigt. Für die nachfolgende Emulsions-PCR (emPCR) wurde ein *amplicon*-

*to-bead-ratio* von 0,7 eingesetzt. Idealerweise setzt sich in der Emulsion genau ein DNA-Strang an ein *bead*. Während der PCR wird der DNA-Strang amplifiziert und somit die Ausgangs-DNA millionenfach am *bead* vervielfältigt. Im nächsten Schritt wurde das Ölgemisch durch Isopropanol und Waschpuffer wieder aufgelöst. Mithilfe der *enrichment beads* wurden erfolgreich mit DNA besetzte *beads* von anderen getrennt. Optimal ist ein Einsatz von 500.000 *beads* pro Sequenzierlauf. Die *beads* wurden durch verschiedene Zentrifugationsschritte, durchgeführt nach Protokoll des Herstellers, in die Vertiefungen der Pico Titer Plate (PTP) eingebettet.

Die Funktionsweise des 454 GS Junior Sequenzierers beruht auf dem parallelisierten *Sequencing-by-Synthesis*-Prinzip, der Pyrosequenzierung. Die vier unterschiedlichen Nukleotide werden in einer festgelegten Reihenfolge der Pico Titer Plate (PTP) zugeführt. Bei erfolgreichem Einfügen am komplementären DNA-Strang wird Pyrophosphat ausgeschüttet. Dieses wird mithilfe der ATP-Sulphurylase zu Adenosintriphosphat (ATP) umgewandelt, welches wiederum als Substrat für die Oxidation von Luciferin dient. Das Enzym Luciferase katalysiert diese Reaktion. Durch die Oxidation entstehen CO<sub>2</sub> und ein Lichtimpuls, der von der *charge-coupled device* (CCD)-Kamera registriert wird. Somit kann durch Erkennen der Lichtimpulse die Basensequenz abgelesen werden. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software GS Amplicon Variant Analyzer (AVA; Version 2.7, Roche). Die AVA Software gleicht die gefundenen Sequenzen mit Referenzsequenzen ab. So können Abweichungen von den Referenzsequenzen (*variants*) und die Anzahl gefundener Mutationen dargestellt werden. Durch Filtereinstellungen wurden nur *variants* ausgewählt, die zu mindestens 5% sowohl im Forward- als auch im Reverse-Strang nachweisbar waren. Diese Sensitivitätsgrenze wurde wie in 4.1.4 angegeben berechnet. In der Auswertung wurden nur solche *variants* berücksichtigt. Die gefundenen Mutationen wurden mit den Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) und bekannten Mutationen aus dem Ensembl Genome Browser verglichen. Anschließend wurden alle bekannten SNPs sowie weiter als acht Basenpaare von der *splice junction* entfernt liegende Polymorphismen und stille Mutationen von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Um durch die *Whole Genome Amplification* (WGA) möglicherweise verursachte Artefakte auszuschließen, wurden alle Mutationen an genomischer, aus Leukozyten isolierter DNA in einem separaten Lauf bestätigt. Dieser wurde wie oben beschrieben mit den entsprechenden Amplicons durchgeführt.

Die Software-Programme Protein Variation Effect Analyzer (PROVEAN) und Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen-2) wurden genutzt, um Informationen über



funktionelle Konsequenzen der Mutationen zu gewinnen. Mit PROVEAN können Aussagen über den Einfluss von Aminosäureaustausch, Insertion und Deletion getroffen werden (Choi et al. 2012). PolyPhen-2 legt den Schwerpunkt auf den Aminosäureaustausch bei Missense-Mutationen und schätzt die Mutation als benigne, möglicherweise schädigend und wahrscheinlich schädigend ein (Adzhubei et al. 2010).

### 3.2.9 Kolonie-Stammzell-Assay

Ausgangsmaterial für die Stammzellanalysen waren kryokonservierte MNC von Patient #9. Die zuvor bei -170°C gelagerten Zellen wurden 10 Minuten lang im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurden sie langsam in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Es wurde Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) mit 10% fetalem Kalbserum (FBS) und DNase im Verhältnis 1 : 1000 hinzugefügt. Nach einer 2-stündigen Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> erfolgte die Zentrifugation für 10 Minuten bei 1200 rpm. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen wurden in IMDM mit 2% FCS resuspendiert und schließlich mit einer Konzentration von 1000 Zellen pro 1 ml MethoCult H4035 Medium ohne Erythropoetin ausgesät.

Nach einer Inkubationszeit von 14 Tagen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden individuelle Kolonien gepickt und in 200 µl PBS gelöst. Davon wurden 150 µl bei 1300 rpm für 10 Minuten für den späteren *BCR-ABL1*-Nachweis mithilfe der FISH-Analyse auf Objektträger zentrifugiert. Die verbliebenen 50 µl dienten als Ausgangsmaterial für die DNA-Amplifikation mittels PicoPLEX WGA Kit (New England Biolabs) für den späteren Mutationsnachweis. Hierfür wurden die Mikrozentrifugationsröhrchen mit den verbleibenden 50 µl Zell-PBS-Gemisch zunächst bei 2200 x g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Danach wurden 4 µl Cell Extraction Buffer hinzugefügt und sofort bei -80°C eingefroren. Nach späterem Auftauen wurde die DNA aus den einzelnen Kolonien mit dem PicoPLEX WGA Kit entsprechend dem vom Hersteller mitgelieferten Protokoll amplifiziert. Mittels Sanger-Sequenzierung erfolgte der Mutationsnachweis.

### 3.2.10 Sanger-Sequenzierung

Die Sanger-Sequenzierung basiert auf der Kettenabbruchmethode, so können fluoreszenzmarkierte Nukleotide abgelesen und die DNA-Sequenz detektiert werden (Sanger et al. 1977). Nach Denaturierung und Primeranlagerung der DNA werden die Einzelstränge mithilfe einer DNA-Polymerase und dNTPs komplementär synthetisiert. Weiterhin befinden sich ddNTPs ohne 3'-Hydroxygruppe im Reaktionsgemisch. Dadurch kann keine Phosphodiesterbindung zwischen 3'-Hydroxygruppe und 5'-Phosphatgruppe des folgenden Nukleotids entstehen. Es werden keine weiteren Nukleotide angelagert und es kommt zur Termination (Shendure et al. 2011). Außerdem sind die ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Fluoreszenzstoffe emittieren eine bestimmte Wellenlänge, die den Basen entsprechend zugeordnet wird. Da dNTPs und ddNTPs miteinander konkurrieren, erfolgt der Einbau zufällig und es bilden sich unterschiedlich lange doppelsträngige DNA-Fragmente. Diese werden während der Sequenzierung in einem speziellen Polymer mittels Kapillarelektrophorese nach ihrer Länge aufgetrennt. Ein Laser regt die Farbstoffe zu Fluoreszenz bei entsprechender Wellenlänge an. Die emittierten Wellenlängen werden von einer CCD-Kamera detektiert und in elektronische Signale umgewandelt.

In dieser Arbeit wurden zunächst die PCR-Produkte der zu untersuchenden Amplicons wie in 3.2.6 beschrieben hergestellt. Das verwendete Protokoll zur Herstellung der Sequenzierprodukte enthält drei wesentliche Schritte:

1. Aufreinigung der PCR-Produkte
2. Sequenzier-PCR
3. Aufreinigung der zu sequenzierenden Fragmente

Für die Aufreinigung wurden 1 µl PCR-Produkt mit 2 µl ExoSAP versetzt. ExoSAP besteht aus Exonuklease und *shrimp alkaline phosphatase* (SAP) in einem Verhältnis von 1:4. Es folgte die Inkubation im Eppendorf Mastercycler entsprechend Tabelle 10. Danach wurde das aufgereinigte PCR-Produkt mit 8 µl Ampuwa verdünnt und für eine Minute bei 1600 rpm geschüttelt. Diese aufgereinigten, verdünnten PCR-Produkte dienten im nachfolgenden Schritt bei der Herstellung des Mastermixes nach Tabelle 11 als Template.

Da die Proben bidirektional sequenziert wurden, wurden sowohl Forward- als auch Reverse-Primer in zwei individuellen Reaktionen eingesetzt. Das Programm für die nachfolgende Sequenzier-PCR ist Tabelle 12 zu entnehmen. Im letzten Schritt wurden die Sequenzierprodukte mit XTerminator™ Solution (Applied Biosystems) durch Schütteln bei

3000 rpm für 30 Minuten aufgereinigt. Die Produkte konnten nun in Sequenzierplatten im ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) platziert werden. Zur Sequenzierung wurde das Programm Rapid Sequencing Pop 6 Polymer genutzt. Die Daten wurden mithilfe der Software Mutation Surveyor von Soft Genetics (Version 5.0, State College, PA, USA) ausgewertet.

**Tabelle 10: Programm zur Aufreinigung der PCR-Produkte**

	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer [min]</b>
Inkubation	37°C	15
Inaktivierung	80°C	15
Kühlung	4°C	nicht begrenzt

**Tabelle 11: Herstellung des Mastermix**

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen [µl]</b>
Ampuwa	12
Ready Reaction Premix	2
BigDye Sequencing Buffer	3
Primer [10mM]	1
Template	2

**Tabelle 12: Programm zur Sequenzier-PCR**

	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>	<b>Zyklen</b>
Denaturierung	96°C	30 sec	25
Annealing	50°C	15 sec	
Elongation	60°C	2 min	
Kühlung	4°C	unbegrenzt	1

### 3.2.11 FISH-Analyse

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung wurde genutzt um in einzelnen Zellkolonien der Stammzell-Kolonie-Assays das *BCR-ABL1*-Fusionsgen nachzuweisen. Bei dieser Methode werden fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden auf das Chromosom hybridisiert. In diesem Fall wurden sowohl der *BCR*- als auch der *ABL1*-Genabschnitt markiert. Mithilfe eines Mikroskops können Aussagen über Lokalisation und Anzahl der Kopien getroffen werden.

Diese Arbeiten wurden von Frau Prof. Dr. med. Claudia Haferlach am Münchner Leukämie Labor (MLL) durchgeführt.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Technische Auswertung**

#### **4.1.1 DNA-Isolation**

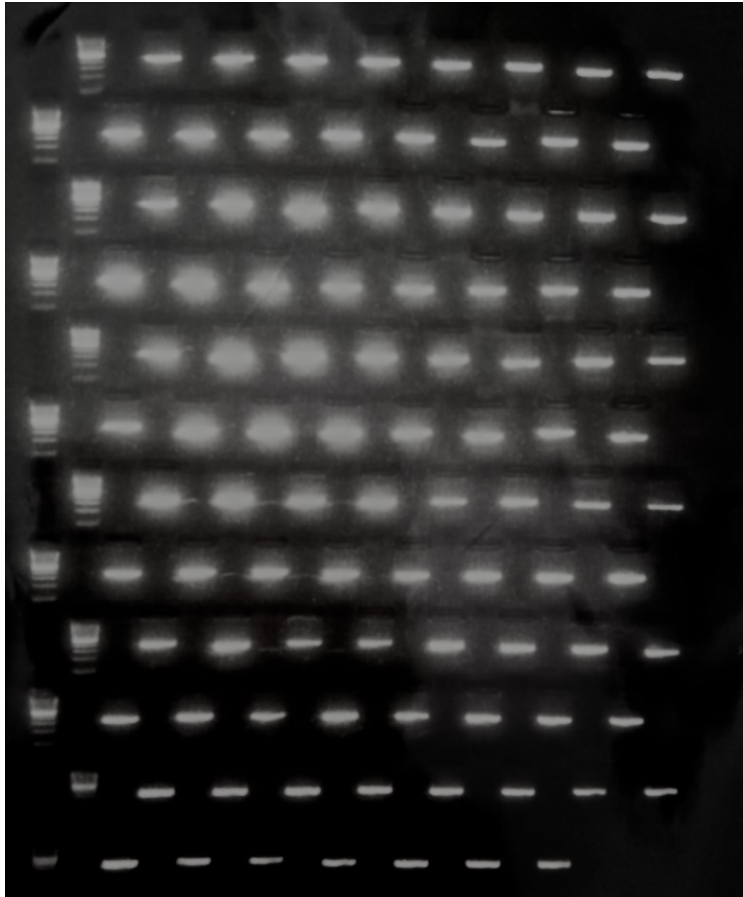
Von allen 21 Patienten wurde aus Leukozyten DNA isoliert. Die durchschnittliche DNA-Konzentration betrug 203,5 ng/μl (Bereich 82 – 476 ng/μl). Bei drei Patienten, die eine Mutation aufwiesen, konnte DNA aus Mundabstrichen isoliert werden. Dabei wurde eine durchschnittliche DNA-Ausbeute von 34,4 ng/μl erreicht (Bereich 21,9 – 46,9 ng/μl).

#### **4.1.2 Whole Genome Amplification**

Da das DNA-Ausgangsvolumen der pädiatrischen Proben gering war und für die Herstellung von jeweils 231 PCR-Produkten pro Probe größere Mengen DNA notwendig waren, wurde die genomische DNA für alle Patientenproben erfolgreich amplifiziert. Zur Erfolgskontrolle diente die PCR eines beliebigen Amplicons der ausgewählten Gene.

#### **4.1.3 Polymerasekettenreaktion**

Für jede Patientenprobe wurden mittels PCR alle 231 Amplicons der 30 ausgewählten Gene hergestellt. Dabei handelte es sich jeweils um 196 Fast Start- und 35 GCrich- Reaktionen. Durch den Einsatz einer Negativkontrolle konnte die Kontamination des Mastermixes mit anderer DNA ausgeschlossen werden. Die Kontrolle mittels Gelbild ist beispielhaft in Abbildung 2 und 3 dargestellt. Alle Amplicons der ausgewählten Gene konnten erfolgreich amplifiziert werden.



**Abbildung 2: Gelelektrophorese der Fast Start Gene.** Beispielhaft sind die Banden von 95 Fast-Start-PCR-Produkten (ASXL1\_12\_1 bis TET2\_3\_2) von Patient #1 dargestellt. In den Taschen auf der linken Seite befindet sich der 100 bp DNA-Längenstandard (Invitrogen) für die Beurteilung der Amplicongröße.

#### 4.1.4 Next Generation Sequencing

Die gesamte Kohorte mit  $n = 21$  Proben wurde mittels NGS analysiert. Dazu wurde pro Patient ein Lauf mit 239 PCR-Amplicons (231 patientenspezifische Amplicons und acht *JAK2*-Kontrollen) durchgeführt. Der Erfolg der Methode wurde anhand der Anzahl der abgelesenen Sequenzen (*reads*) überprüft. Der Umfang der einzelnen *reads* wird nachfolgend als *coverage* zusammengefasst. Es wurde eine mediane *coverage* von 113.682 *reads* und eine mittlere *coverage* von 113.762 erreicht, der Bereich lag zwischen 76.490 und 146.808 *reads*. Die erreichten Gesamtcoverages der einzelnen Läufe sind Abbildung 3 zu entnehmen.

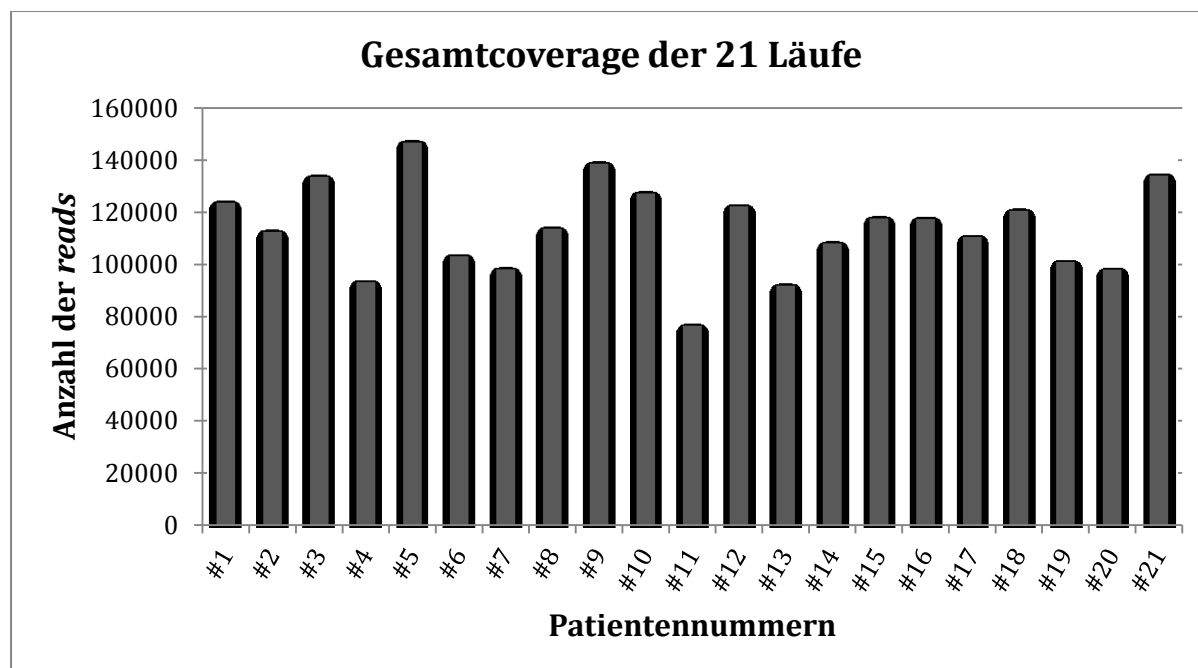


Abbildung 3: Darstellung der Patientennummern und reads pro Lauf.

In Tabelle 13 sind die *reads* pro Amplicon inklusive *JAK2*-Kontrollen der einzelnen Läufe dargestellt. Es wurde ein Median von 396,00 *reads* pro Amplicon (Bereich der Mediane 267,00 – 567,00) und ein Mittelwert von 463,26 *reads* (Bereich der Mittelwerte 319,61 – 584,66) erzielt, der gesamte Bereich betrug 33 – 6861 *reads*.

Tabelle 13: Übersicht über mediane und mittlere *reads* der 21 Läufe.

Patientennummer	Median	Mittelwert	Bereich
#1	467,00	512,01	131 – 1332
#2	416,00	460,04	81 – 2529
#3	460,00	558,94	106 – 2105
#4	357,00	383,44	136 – 2041
#5	567,00	584,66	109 – 1241
#6	331,00	374,96	106 – 1102
#7	367,00	392,01	84 – 884
#8	435,00	470,03	100 – 1708
#9	531,00	576,62	190 – 1564
#10	445,00	522,86	152 – 1709
#11	276,00	319,61	85 – 1475
#12	448,00	504,05	96 – 1562
#13	315,00	378,75	62 – 1589
#14	380,00	432,95	33 – 1495
#15	270,00	369,83	96 – 2431
#16	396,00	504,60	68 – 1974
#17	425,00	524,79	141 – 6861

Patientennummer	Median	Mittelwert	Bereich
#18	350,00	497,99	101 – 1882
#19	267,00	377,85	81 – 2261
#20	344,00	421,51	80 – 1707
#21	500,00	561,16	169 – 1619
<b>gesamt</b>	396,00	463,26	33 – 6861

Mit dem Median der *reads* pro Amplicon aller Läufe (n = 21) kann mithilfe der folgenden Formel die Sensitivitätsgrenze berechnet werden. Die *Minimum reads* beziehen sich auf die Anzahl an *reads*, die notwendig ist um *variants* zuverlässig zu erkennen.

$$\text{Sensitivitätsgrenze} = \frac{100\%}{\text{Median der reads pro Amplicon}} \cdot \text{Minimum reads}$$

$$\text{Sensitivitätsgrenze} = \frac{100\%}{396} \cdot 20 = 5,05\%$$

Eine Sensitivitätsgrenze von ca. 5% konnte demnach theoretisch erreicht werden.

#### 4.1.5 JAK2 V617F Sensitivitätskontrollen

In jedem Lauf wurden zusätzlich zu den 231 Amplicons acht *JAK2*-Sensitivitätskontrollen analysiert, die unterschiedliche Anteile der Punktmutation *V617F* enthielten. Mithilfe dieser konnte die tatsächliche Sensitivität und Qualität jedes einzelnen NGS-Laufs kontrolliert werden.

In Tabelle 14 sind mediane und mittlere *reads* sowie Bereiche der *reads* der *JAK2*-Sensitivitätskontrollen angegeben. Tabelle 15 zeigt Median, Minimum und Maximum sowie Standardabweichung der gefundenen Mutationsanteile der einzelnen Kontrollen.

**Tabelle 14: Sensitivitätskontrollen.** Median, Mittelwert und Bereich der *reads* der acht Sensitivitätskontrollen

Amplicon	Median	Mittelwert	Bereich
<i>JAK2</i> V617F 0,1%	319	338,81	128 – 619
<i>JAK2</i> V617F 0,5%	291	335,19	104 – 779
<i>JAK2</i> V617F 1%	302	349,10	137 – 1027
<i>JAK2</i> V617F 5%	281	310,86	137 – 576
<i>JAK2</i> V617F 10%	426	494,43	100 – 1377
<i>JAK2</i> V617F 20%	360	441,05	191 – 1791

<b>Amplicon</b>	<b>Median</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Bereich</b>
<i>JAK2</i> V617F 50%	338	353,90	162 – 735
<i>JAK2</i> V617F 100%	325	398,81	62 – 877
Gesamt	322	377,77	62 – 1791

**Tabelle 15: *JAK2*-V617F-Mutationsanteile.** V617F-Mutationsanteile in der *JAK2*-Sensitivitätskontrolle, Median, Minimum und Maximum des Mutationsanteils ermittelt durch NGS, sowie Standardabweichung (SD)

<b>Tatsächlicher <i>JAK2</i> V617F Mutationsanteil (%) in Sensitivitätskontrolle</b>	<b>Median des Mutationsanteils (%) mittels NGS</b>	<b>Minimum des Mutationsanteils (%) mittels NGS</b>	<b>Maximum des Mutationsanteils (%) mittels NGS</b>	<b>SD</b>
0,10	0,00	0,00	0,00	0,00
0,50	0,00	0,00	0,00	0,00
1,00	0,00	0,00	1,06	0,26
5,00	3,18	0,00	6,41	1,83
10,00	10,00	5,35	13,48	2,02
20,00	20,81	15,18	26,16	5,19
50,00	55,94	51,96	61,95	2,66
100,00	100,00	98,94	100,00	0,24

Demnach konnte die theoretisch errechnete Sensitivitätsgrenze von 5% in der Praxis bestätigt werden.



## 4.2 Mutationen

### 4.2.1 Mutationen mit funktioneller Auswirkung

Als funktionell relevante Veränderungen wurden Mutationen angesehen, bei denen es auf Proteinebene zu einer Veränderung oder einem Abbruch der Aminosäure-Sequenz kommt. Alle Mutationen wurden in einem separaten NGS-Lauf an genomischer DNA verifiziert. Als somatisch wurden Mutationen betrachtet, die nur in der gDNA, nicht jedoch in der konstitutionellen DNA aus Mundabstrichen nachgewiesen werden konnten. Die DNA-Analyse der Mundabstriche wurde mittels Sanger-Sequenzierung (#5 und #13) und NGS (#3) durchgeführt. Die Mutationen sind in Tabelle 16 aufgelistet.

Tabelle 16: Mutationen mit funktioneller Auswirkung.

Proben-nummer	Gen	Variant Ensembl	Aminosäure-austausch	Ensembl Eintrag	Mutations-anteil (%) in WGA DNA	Mutations-anteil (%) in gDNA	Mutations-anteil (%) in MA
#3 (M)	<i>ASXL1</i>	c.3187C>T	p.R1063X	somatic mutation found in human cancers (COSM41715)	7,5	4,9	0,0
#5 (M)	<i>ASXL1</i>	c.2062C>T	p.R688X	somatic mutation found in human cancers, (COSM51388, COSM4169684) and SNP (rs373221034)	29,2	46,1	0,0
#13 (W)	<i>ASXL1</i>				22,9	21,0	0,0
#9 (W)	<i>ASXL1</i>	c.2767G>T	p.E923X	not displayed in Ensembl	6,2	6,0	n.u.
#10 (W)	<i>ASXL1</i>	c.2224delT	p.S742PfsX25	not displayed in Ensembl	12,9	11,4	n.u.
#20 (M)	<i>ASXL1</i>	c.2549_2552delATTG	p.D850AfsX11	SNP (rs755989932)	34,0	23,3	n.u.
<b>Abkürzungen:</b> <i>ASXL1</i> , <i>Additional sex combs like 1</i> ; gDNA, genomische DNA; M, männlich; MA, Mundabstrich; n.u. nicht untersucht; SNP, <i>Single nucleotide polymorphism</i> ; W, weiblich; WGA, <i>Whole Genome Amplification</i> .							

Alle gefundenen Mutationen betreffen das Gen *ASXL1*. In Probe #3 wurde die Mutation c.3187C>T identifiziert. Diese Mutation ist laut Genome Ensembl Browser bekannt und wurde schon zuvor in onkologischen Erkrankungen des hämatopoetischen und lymphatischen Systems nachgewiesen. Probe #3 enthielt die Mutation zu 4,9% in genomischer DNA. Es konnte gezeigt werden, dass sie bei diesem Patienten in der DNA aus Mundschleimhaut nicht vorhanden ist.

Die Mutation c.2062C>T konnte sowohl in Probe #5 als auch in Probe #13 gefunden werden. Es handelt sich um eine bekannte Mutation, die in Assoziation mit Pankreaskarzinomen, Kolonkarzinomen, Tumoren des zentralnervösen Systems sowie onkologischen Erkrankungen des hämatopoetischen und lymphatischen Systems auftritt. In Probe #5 wurde die Mutation c.2062C>T in genomischer DNA zu 46,1% detektiert. Probe #13 wies dieselbe Mutation zu einem Anteil von 21,0% auf. In beiden Fällen konnte die Mutation in aus Mundschleimhaut isolierter DNA nicht nachgewiesen werden.

In Probe #9 fand sich die Nonsense-Mutation c.2767G>T. Bisher gibt es im Ensembl Genome Browser keine Information zu dieser Mutation. Der Mutationsanteil lag in genomischer DNA bei 6,0%. Die Mutationen c.3187C>T, c.2062C>T und c.2767G>T werden als Nonsense-Mutationen bezeichnet, da der Basenaustausch von Cytosin zu Thymin (c.3187C>T, c.2062C>T) bzw. von Guanin zu Thymin (c.2767G>T) die Entstehung eines Stop-Codons verursacht. Es kommt zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteinbiosynthese und somit hat die Mutation eine Auswirkung auf die Länge und wahrscheinlich auch Funktion des Proteins.

Probe #10 beinhaltetete die Mutation c.2224delT. Diese Mutation ist nicht im Ensembl Genome Browser aufgeführt und zeigte hier einen Mutationsanteil von 11,4% in genomischer DNA. Eine weitere Mutation konnte in Probe #20 detektiert werden. Es handelt sich um die Mutation c.2549\_2552delATTG. Im Ensembl Genome Browser ist diese als bekannte Deletion verzeichnet. Der Mutationsanteil in Probe #20 betrug 23,3% in genomischer DNA. Bei den beiden letztgenannten Mutationen c.2224delT und c.2549\_2552delATTG handelt es sich um Deletionen, die zu einer Frameshift-Verschiebung und einem damit verbundenen vorzeitigen Abbruch der Proteinbiosynthese führen.

Die quantitativen Werte für die in amplifizierter DNA detektierten Mutationsanteile können Tabelle 16 entnommen werden und stimmen gut mit den Mutationsanteilen in genomischer DNA überein. Für die Proben #9, #10 und #20 konnte das Vorkommen der Mutationen im Mundabstrich nicht untersucht werden, da die Patienten bereits in den 1990er Jahren verstorben sind.

#### **4.2.2 Mutationen ohne funktioneller Auswirkung (SNPs und *silent mutations*)**

Die folgende Tabelle zeigt gefundene SNPs und stille Mutationen. Diese Veränderungen gehören zu den normalen Polymorphismen und Varianten des menschlichen Genoms. Daher wurden sie für die Auswertung als nicht relevant angesehen.

Tabelle 17: SNPs und stille Mutationen.

Gen	Variant Ensembl	Amino- säure- austausch	Ensembl Eintrag	Polyphen2/ PROVEAN	Proben- nummer	Mutations- anteil (%) in WGA DNA
<i>ASXL1</i>	c.2429T>C	p.P810L	SNP (rs6058694)	benigne/ toleriert	#1, #3-11, #13-20	100
					#2, #21	99,73
					#12	99,67
					#16	40,22
<i>ASXL1</i>	c.2970C>T	p.H990	SNP (rs62206933), synonymous coding	-	#15	56
<i>ASXL1</i>	c.3133A>G	p.M1045V	somatic mutation found in human cancers (COSM96384) and SNP (rs370804022)	benigne/ toleriert	#10	53,67
<i>ASXL1</i>	c.3291G>T	p.E1097D	somatic mutation found in human cancers (COSM36205) and SNP (rs139115934)	wahrsch. schädigend/ schädigend	#11	4,96
<i>ASXL1</i>	c.3744T>G	p.S1248	SNP (rs4911231), synonymous coding	-	#1	56,4
					#2	41,12
					#3	56,3
					#5	7,61
					#7	93,75
					#9	55,65
					#10	61,99
					#11	58,47
					#12	38,89
					#15	55,56
					#16	58,94
<i>CSF3R</i> <i>DNMT3A</i>	c.1761C>T c.27C>T	p.L587 p.P9	SNP (rs149239453), synonymous coding SNP (rs41284843), synonymous coding	- -	#18	37,9
					#19	45,13
					#21	54,1
					#2	40,23
					#1	30,9

Gen	Variant Ensembl	Amino- säure- austausch	Ensembl Eintrag	Polyphen2/ PROVEAN	Proben- nummer	Mutations- anteil (%) in WGA DNA
					#5	35,77
					#7	46,84
					#1, #4, #9, #14-16, #19, #21	100
					#2	45,09
					#3	46,9
					#5	46,25
					#6	47,42
					#7	92,06
					#8	48,79
					#10	59,61
					#11	44,09
					#13	98,93
					#17	42,55
					#18	41,05
					#20	45,47
					#1	41,2
					#2	46,91
					#4	39,49
					#13	40,94
					#14	45,77
					#16	40,44
					#17	44,44
					#5	41,65
					#6	49,32
					#14	50,37
					#14	29,55
<i>DNMT3A</i>	c.1122+7G>A	n/a	splice region variant (rs2276599)	-		
<i>DNMT3A</i>	c.1266G>A	p.L422	SNP (rs2276598), synonymous coding	-		
<i>ETV6</i>	c.258G>A	p.T86	SNP (rs11611479), synonymous coding	-		
<i>ETV6</i>	c.765A>T	p.P255	SNP (rs148116823), synonymous coding	-		

Gen	Variant Ensembl	Amino- säure- austausch	Ensembl Eintrag	Polyphen2/ PROVEAN	Proben- nummer	Mutations- anteil (%) in WGA DNA
<i>EZH2</i>	c.234C>T	p.R78	SNP (rs140399505), synonymous coding	-	#4	51,43
<i>EZH2</i>	c.553G>C	p.D185H	somatic mutation found in human cancers (COSM3762469) and SNP (rs2302427)	benigne/ schädigend	#1	45,21
					#3	44,6
					#9	38,45
<i>EZH2</i>	c.1731G>A	p.P577	SNP (rs41277437), synonymous coding	-	#16	45,2
<i>EZH2</i>	c.2110+6T>G	n/a	splice region variant (rs41277434)	-	#4	44,22
					#8	100
<i>IDH1</i>	c.315C>T	p.G105	somatic mutation found in human cancers (COSM253316) and SNP (rs11554137), synonymous coding	-	#5	41,17
					#12	47,2
<i>KIT</i>	c.2394C>T	p.I789	Somatic mutation found in human cancers (COSM1307) and SNP (rs55789615), synonymous coding	-	#13	43,71
					#17	49,37
<i>NOTCH1</i>	c.4129C>T	p.P1377S	SNP (rs61751542)	benigne/ toleriert	#17	51,16
					#1	37,36
					#4, #13	100
					#6	46,82
					#7	53,9
					#11	57,99
					#14	50,95
<i>NOTCH1</i>	c.5094C>T	p.D1698	somatic mutation found in human cancers (COSM33747, COSM1461158) and SNP (rs10521), synonymous coding	-	#15	45,68
					#16	38,27
					#19	36,84
					#20	65,17
					#21	55,38
<i>NOTCH1</i>	c.5175C>T	p.T1725	SNP (rs61751536), synonymous coding	-	#15	64,38
<i>NOTCH1</i>	c.5988G>A	p.T1996	SNP (rs186453356), synonymous coding	-	#5	31,85

Gen	Variant Ensembl	Amino- säure- austausch	Ensembl Eintrag	Polyphen2/ PROVEAN	Proben- nummer	Mutations- anteil (%) in WGA DNA
<i>NOTCH1</i>	c.6555C>T	p.D2185	SNP (rs2229974), synonymous coding	-	#1	39,58
					#3	99,6
					#4	100
					#5	86,82
					#6	99,02
					#7	51,99
					#10	35,09
					#11	60,55
					#13	99,3
					#14	49,32
					#15	40,11
					#16	43,63
					#17	52,24
					#19	30,41
					#20	66,73
					#21	48,95
<i>NOTCH1</i>	c.7250C>T	p.P2417L	somatic mutation found in human cancers (COSM27924) and SNP (rs370652630)	benigne/ toleriert	#9	48,67
<i>p53</i>	c.108G>A	p.P36	SNP (rs1800370), synonymous coding	-	#3	45,9
					#12	52,67
<i>p53</i>	c.215C>G	p.P72R	somatic mutation found in human cancers (COSM250061) and SNP (rs1042522)	benigne/ toleriert	#1	58,68
					#2	97,26
					#3	54,1
					#4	99,16
					#5	98,18
					#6	99,38
					#7	97,97



Gen	Variant Ensembl	Amino- säure- austausch	Ensembl Eintrag	Polyphen2/ PROVEAN	Proben- nummer	Mutations- anteil (%) in WGA DNA
<i>p53</i>					#8	98,61
					#9	98,96
					#10	52,49
					#11	97,21
					#13	50,57
					#14	46,15
					#15	100
					#16	56,85
					#17	94,65
					#18	98,7
					#19	50,42
					#20	45,01
					#21	99,21
					#19	37,5
					#20	44,41
					#1	56,48
					#2	50,78
					#4	52,82
					#6	0,7
					#1	99,85
					#2	99,56
					#3, #6, #12-18, #20-21	100
<i>SRSF2</i>	c.144C>T	p.D48	SNP (rs237057), synonymous coding	-	#4	99,78
					#5	54,66
					#7	95
					#8	99,67

Gen	Variant Ensembl	Amino- säure- austausch	Ensembl Eintrag	Polyphen2/ PROVEAN	Proben- nummer	Mutations- anteil (%) in WGA DNA
					#9	99,79
					#10	99,8
					#11	45,31
<i>SRSF2</i>	c.402T>C	p.S134	SNP (rs237058), synonymous coding	-	#1-11, #14-21	100
					#12	99,6
					#13	99,83
<i>TET2</i>	c.86C>G	p.P29R	SNP (rs12498609)	möglicherw. schädigend/ schädigend	#2	38,52
					#20	58,96
<i>TET2</i>	c.100C>T	p.L34F	SNP (rs111948941)	benigne/ schädigend	#15	59,89
					#14	28,21
<i>TET2</i>	c.652G>A	p.V218M	SNP (rs6843141)	benigne/ toleriert	#15	42,36
					#16	0,85
					#18	2,03
<i>TET2</i>	c.978A>G	p.K326	SNP (rs201837804), synonymous coding	-	#16	43,04
<i>TET2</i>	c.1064G>A	p.G355D	SNP (rs61744960)	möglicherw. schädigend/ schädigend	#6	100
					#14	38,75
<i>TET2</i>	c.1088C>T	p.P363L	SNP (rs17253672)	benigne/ schädigend	#14	1,81
					#15	44,86
					#21	41,56
					#4	51,56
<i>TET2</i>	c.5162T>G	p.L1721W	SNP (rs34402524)	möglicherw. schädigend/ schädigend	#5	3,18
					#8	53,44
					#11	47,79

Gen	Variant Ensembl	Amino- säure- austausch	Ensembl Eintrag	Polyphen2/ PROVEAN	Proben- nummer	Mutations- anteil (%) in WGA DNA
TET2	c.5284A>G	p.I1762V	SNP (rs2454206)	benigne/ toleriert	#13	46,49
					#15	55,12
					#19	49,39
					#21	37,02
					#3	54,3
					#4	49,86
					#5	2,12
					#6	100
					#7	49,87
					#9	51,31
					#10	53,23
					#11	47,79
					#13	50,54
					#14	46,39
					#16	57,49
					#17	53,33
					#19	49,7
TET2	c.5333A>G	p.H1778R	SNP (rs62621450)	möglicherw. schädigend/ schädigend	#5	44,21
UTX	c.825G>A	p.K275	kein Eintrag in Ensembl, synonymous coding	-	#15	42,14
UTX	c.2177C>A	p.T726K	SNP (rs2230018)	benigne/ toleriert	#14	11,11
					#5	93,83
					#7	7,51
					#9	51,56
					#10	50,23
					#11	96,49

Gen	Variant Ensembl	Amino- säure- austausch	Ensembl Eintrag	Polyphen2/ PROVEAN	Proben- nummer	Mutations- anteil (%) in WGA DNA
UTX	c.3111G>A	p.Q1037	somatic mutation found in human cancers (COSM1179848) and SNP (rs20539), synonymous coding	-	#14	93,71
					#19	38,78
WT1	c.1107A>G	p.R369	somatic mutation found in human cancers (COSM1353507, COSM1353508) and SNP (rs16754), synonymous coding	-	#13	42,42
					#4	100
					#5	23,27
					#12	23,23
					#13	25,5
ZRSR2	c.864C>T	p.N288	SNP (rs2301724), synonymous coding	-	#20	33,74
					#1, #4, #6, #8, #10, #13-17	100
					#9	58,39
					#11	43,42
					#19	62,62
ZRSR2	c.1338_1343d upGAGCCG	p.S447_R448 dup	SNP (rs751917781)	- / neutral	#14	98,58
<b>Abkürzungen:</b> ASXL1, Additional sex combs like 1; CSF3R, Colony stimulating factor 3 receptor; DNMT3A, DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha; ETV6, ETS variant 1; EZH2, Enhancer of zeste homologe 2; IDH1, Isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 1, cytosolic; KIT, KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase; möglicherw., möglicherweise; NOTCH1, Notch homolog 1; p53, Tumor protein p53; SF3B1, Splicing factor 3b subunit 1; SRSF2, Serine/arginine-rich splicing factor 2; SNP, Single nucleotide polymorphism; TET2, Tet methylcytosine dioxygenase 2; UTX, Lysine (K)-specific demethylase 6A; wahrsch., wahrscheinlich; WGA, Whole Genome Amplification; WT, Wilms tumor 1; ZRSR2, Zinc finger CCCH-type, RNA binding motif and serine/arginine rich 2.						

### 4.3 Kolonie-Stammzell-Assay

#### 4.3.1 Kolonienwachstum

Nach zwei Wochen Inkubationszeit waren die Zellkolonien, ausgehend von MNC von Patient #9, ausreichend gewachsen. Es konnten 188 Kolonien gepickt werden. Dabei wurde auf einen ausreichenden Abstand zu den benachbarten Kolonien geachtet. Ein Teil der Zellen individueller Kolonien wurde erfolgreich auf Objektträger für die spätere FISH-Analyse zentrifugiert. Aus den verbliebenen Zellen wurde DNA zur Mutationsanalyse mittels Sanger-Sequenzierung amplifiziert. Zur Erfolgskontrolle der Amplifikation wurde eine PCR mit dem Primer für das Amplicon ASXL1\_12\_5 angefertigt. Abbildung 4 zeigt eine Kolonie der MNC von Patient #9, die mit *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) angereichert wurde.

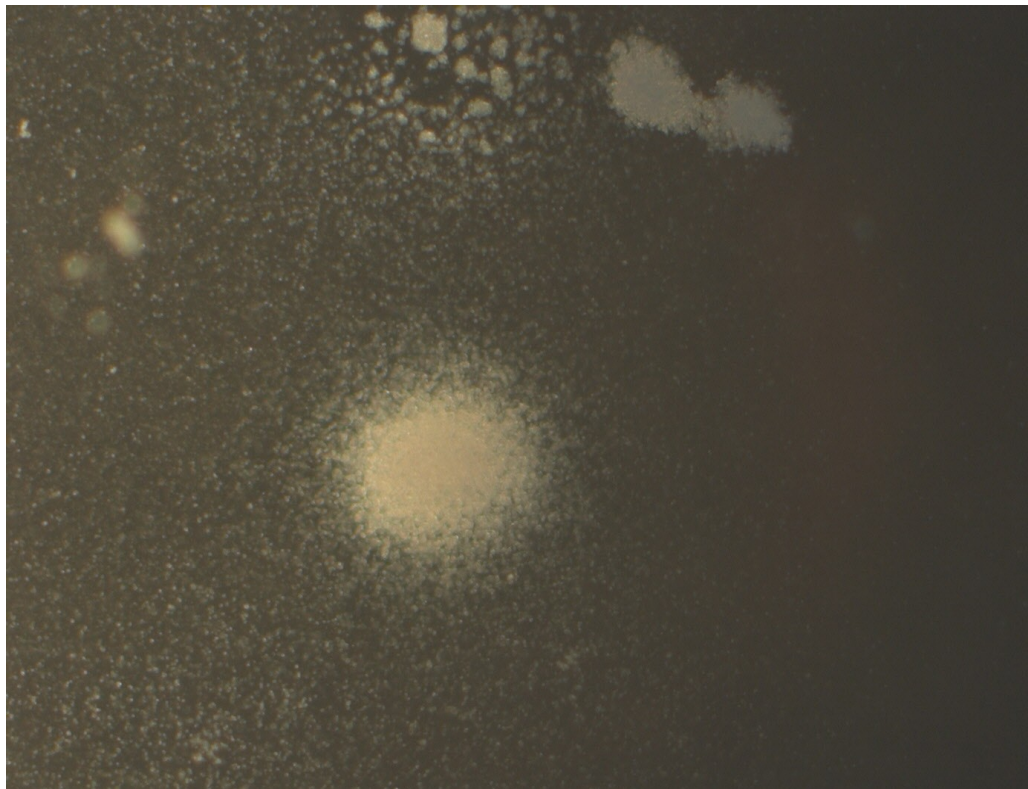
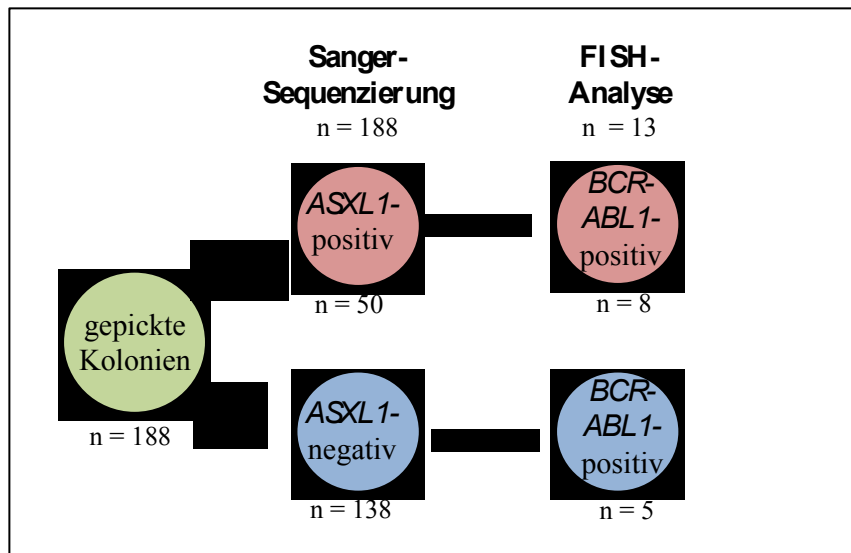


Abbildung 4: GM-CSF-Kolonie der MNC von Patient #9.

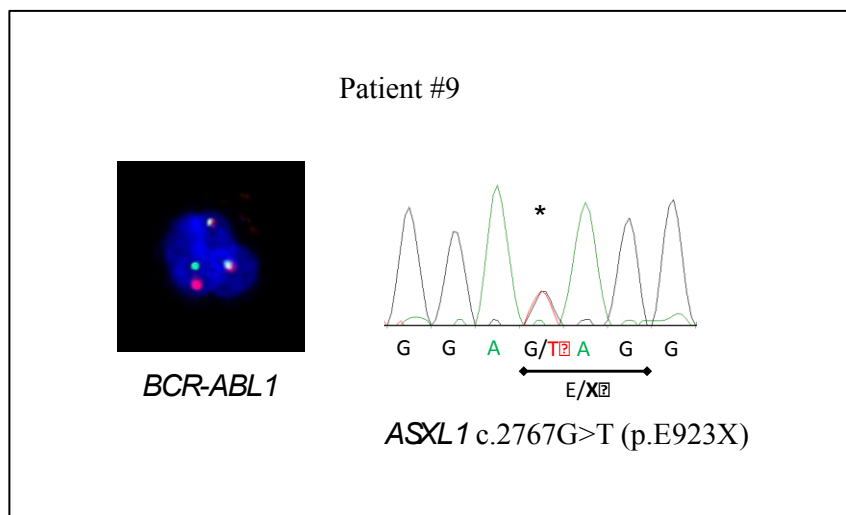
#### 4.3.2 Mutations- und *BCR-ABL1*-Nachweis

Die Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung zeigten, dass 50 von 188 Kolonien die Mutation p.E923X auf dem Gen *ASXL1* enthielten. Alle Mutationen waren heterogen, da sie einen Mutationsanteil zwischen 40% und 60% aufwiesen.

Für den *BCR-ABL1*-Nachweis mittels FISH-Analyse wurden jeweils zehn *ASXL1*-mutationspositive und -negative Objektträger ausgewählt. Bei 13 von 20 Objektträgern wiesen die Zellen eine gute Qualität auf, sodass sie für die FISH-Analyse verwendet werden konnten. Darunter waren acht Objektträger mit mutationspositiven Kolonien und fünf mit mutationsnegativen Kolonien. Das Ergebnis zeigte, dass sowohl die mutationspositiven als auch die mutationsnegativen Kolonien *BCR-ABL1*-positiv waren. Diese Inhalte sind schematisch in Abbildung 5 dargestellt. Abbildung 6 zeigt die Ergebnisse von FISH-Analyse und Sanger-Sequenzierung.



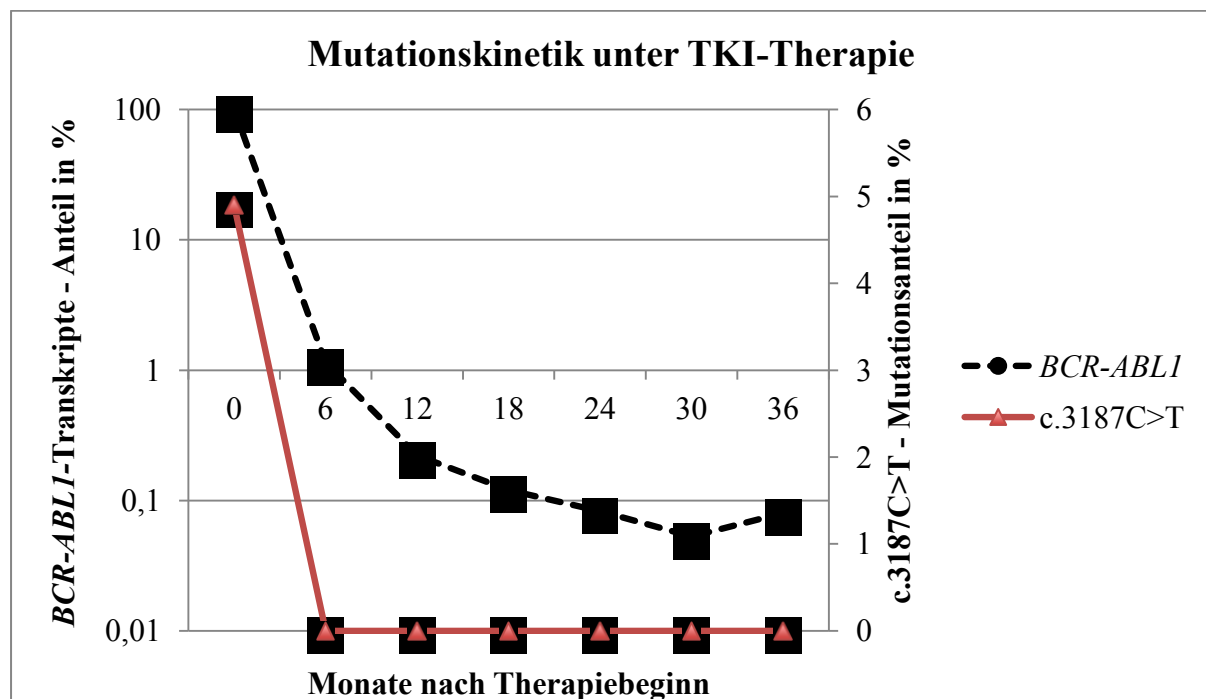
**Abbildung 5: Darstellung der Ergebnisse von Sanger-Sequenzierung und FISH-Analyse.** Der Ausdruck *ASXL1*-positiv bzw. -negativ bezieht sich auf das Vorliegen der Mutation c.2767G>T im Gen *ASXL1*.



**Abbildung 6: FISH-Analyse und Sanger-Sequenzierung.** In der FISH-Analyse fusionieren *BCR*- und *ABL1*-Anteile (gelb). Die Sanger-Sequenzierung zeigt die Mutation c.2767G>T. Die Zelle ist somit *BCR-ABL1*- und *ASXL1*-positiv.

#### 4.4 Kontrolle der Mutationskinetik unter Therapie

Anhand der Daten von Patient #3 war eine Verlaufskontrolle bezüglich der Kinetik der *ASXL1*-Mutation möglich. Patient #3 wies bei Diagnosestellung die Mutation c.3187C>T bzw. p.R1063X auf. Es wurde eine Therapie mit Nilotinib begonnen. Nach 6 Monaten erfolgte ein Wechsel der Therapie auf Imatinib, nach weiteren 2 Monaten auf Dasatinib. Benannte Mutation konnte im Therapieverlauf bis 36 Monate nach Therapiebeginn nicht mehr nachgewiesen werden. Der Patient befand sich in Remission. Der Anteil der *BCR-ABL1*-Transkripte sank auf Werte zwischen 1,144% nach 6 Monaten und 0,88% nach 36 Monaten. Das Diagramm in Abbildung 7 zeigt den Anteil der Mutation c.3187C>T in *ASXL1* (rot) sowie die *BCR-ABL1*-Menge (schwarz) im Verlauf der Therapie.



**Abbildung 7: Mutationskinetik unter TKI.** Nach Therapiebeginn mit TKI verringerte sich die *BCR-ABL1*-Menge auf Werte zwischen 1,144% nach 6 Monaten und 0,88% nach 36 Monaten. Die Mutation c.3187C>T in *ASXL1* war nicht mehr nachweisbar.



#### 4.5 Korrelation der *ASXL1*-Mutationen mit klinischen Verläufen

In Tabelle 1 sind die klinischen Daten der Patienten aus der verwendeten Kohorte zusammengefasst. Insgesamt wurden 17 von 21 Patienten vor Beginn der Imatinib-Ära diagnostiziert und somit mittels allogener Stammzelltransplantation (allo SCT) behandelt. Die verbleibenden vier Patienten der Kohorte wurden mit TKI behandelt.

Von den 17 transplantierten Patienten sind zehn Patienten verstorben. Im Gegensatz dazu sind alle vier mit TKI behandelten Patienten am Leben. Die Patienten mit Mutation fallen sowohl in die Gruppe der mit TKI behandelten Patienten (n=1) als auch in die der transplantierten Patienten (n=5). Abbildung 8a zeigt das Überleben aller Patienten mit Mutation im *ASXL1*-Gen (Abb. rot) und ohne Mutation (Abb. schwarz).

Da durch unterschiedliche Therapien Verzerrungen der Überlebenskurven entstehen könnten, wird in Abbildung 8b nur das Überleben der Patienten beleuchtet, die mittels allo SCT behandelt wurden (n=17). Dabei handelt es sich um fünf Patienten mit Mutation (Abb. rot) und zwölf Patienten ohne Mutation (Abb. schwarz) im Gen *ASXL1*.

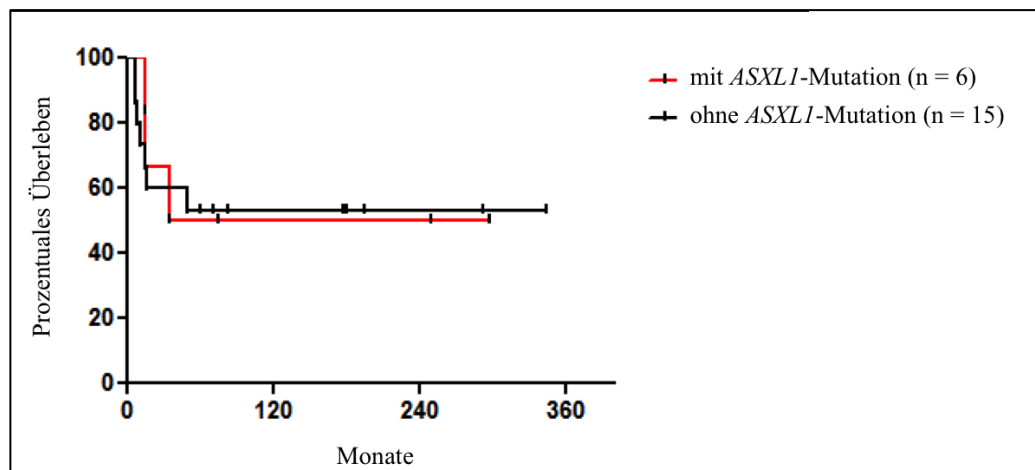


Abbildung 8a: Kaplan-Meier-Überlebenskurve aller Patienten.

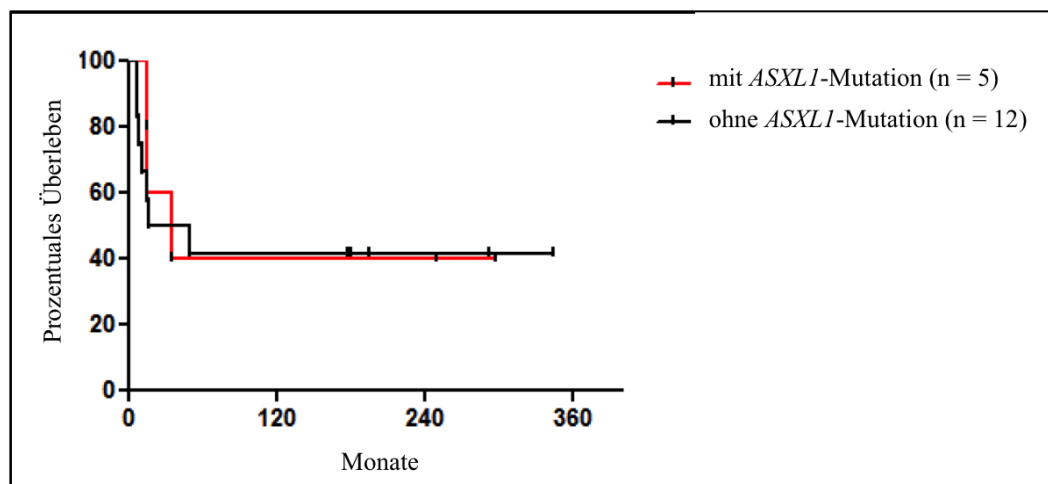


Abbildung 8b: Kaplan-Meier-Überlebenskurve der mittels allo SCT behandelten Patienten.

## 5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, analog zu den Erkenntnissen bezüglich *BCR-ABL1*-unabhängiger Mutationen bei erwachsenen CML-Patienten (Schmidt et al. 2014) das Vorkommen von solchen bei CML-Patienten im Kindes- und jungen Erwachsenenalter zu untersuchen. Die Hypothese hat sich bestätigt, *BCR-ABL1*-unabhängige Mutationen treten auch bei der CML im Kindes- und jungen Erwachsenenalter auf. Die betroffenen Patienten hatten bei Erstdiagnose und damit bei Feststellen der Mutation ein Alter von 13 - 27 Jahren erreicht. Interessanterweise betreffen die gefundenen Mutationen ausschließlich das Gen *ASXL1*.

Die in dieser Arbeit ermittelte Prävalenz für *ASXL1*-Mutationen bei CML im Kindesalter in chronischer Phase (CP) betrug 29%. Da solche Mutationen bei der CML im Kindesalter erstmals in vorliegender Arbeit beschrieben wurden, liegen hierfür bislang keine Vergleichsuntersuchungen vor.

Bei erwachsenen CML-Patienten wird die Prävalenz von *ASXL1*-Mutationen in der Literatur nicht einheitlich beschrieben. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten *ASXL1*-Mutationen bei einem von 15 CML-Patienten bei Erstdiagnose nachgewiesen werden (Schmidt et al. 2014). Boulton et al. konnten 2010 erstmals *ASXL1*-Mutationen als neue Aberrationen in sechs von 41 erwachsenen CML-Patienten vor Imatinib-Therapie nachweisen. Jedoch befanden sich drei der sechs erwachsenen CML-Patienten bereits in der Blastenkrise (Boulton et al. 2010). Eine iranische Studie brachte bei der Untersuchung von 66 erwachsenen CML-Patienten bei Erstdiagnose auf *JAK2 V617F*- und *ASXL1*-Mutationen eine Prävalenz von 7,6% für *ASXL1*-Mutationen hervor (Valikhani et al. 2017). In Untersuchungen einer japanischen Forschungsgruppe wurden 24 CML-Patienten in chronischer Phase bei Erstdiagnose mittels *Whole Genome Sequencing* (WES) auf somatische Mutationen analysiert. Es konnten in drei Patienten *ASXL1*-Mutationen nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Prävalenz von 12,5 % (Togasaki et al. 2017).

Somit liegt die in dieser Arbeit gefundene Prävalenz von *ASXL1*-Mutationen bei CML-Patienten im Kindesalter mit einem Wert von 29% deutlich höher als bei erwachsenen CML-Patienten. Möglicherweise spielen die Mutationen bei der Pathogenese der CML im Kindesalter eine stärker herausragende Rolle als bei der CML im Erwachsenenalter.

*ASXL1*-Mutationen können altersassoziiert auftreten, wie es Jaiswal et al. in ihrer Studie zeigten. Dort sind bei der Untersuchung älterer Patienten ohne hämatologische Erkrankungen in einer mit dem Alter steigenden Anzahl Mutationen aufgetreten, vor allem in den Genen *DNMT3A*, *TET2* und *ASXL1* (Jaiswal et al. 2014). Ähnliche Ergebnisse lieferten Genovese et al., die mittels WES 12.380 nicht nach hämatologischen Erkrankungen ausgewählte Personen im Alter von 19 bis 93 Jahren analysierten. Eine klonale Hämatopoese mit somatischen Mutationen, vor allem in den Genen *DNMT3A*, *TET2* und *ASXL1*, wurde in 10% der über 65-Jährigen, jedoch nur in 1% der unter 50-Jährigen festgestellt. Somit steigt die Anzahl der Mutationen mit dem Alter der Patienten (Genovese et al. 2014). Dafür sprechen auch die Erkenntnisse einer Studie von Xie et al. Darin wurden die klonale hämatopoetische Expansion und gleichzeitig auftretende Mutationen in Leukämie-assoziierten Genen bei 2% der untersuchten Patienten ohne hämatologische Erkrankungen nachgewiesen. Dieser Wert stieg bei den über 70-Jährigen auf 5 - 6 % (Xie et al. 2014).

Im Gegensatz dazu legt in vorliegender Arbeit der Nachweis von *ASXL1*-Mutationen bei CML im Kindesalter jedoch nahe, dass es sich bei den hier gefundenen Mutationen nicht um altersassoziierte Mutationen handelt.

Die hier verwendete Kohorte (n = 21) schloss Patienten im Alter von 0 - 27 Jahren ein. Mutationen im Gen *ASXL1* traten nicht im Säuglings-, Kleinkind- und Kindesalter, sondern erst im Jugendlichenalter ab 13 Jahren auf. Daraus kann man schlussfolgern, dass die gefundenen *ASXL1*-Mutationen mit einem späteren Erkrankungsalter innerhalb des Kindes- bis Adoleszentenalters assoziiert sind.

Die meisten in der Literatur beschriebenen *ASXL1*-Mutationen befinden sich im Exon 12. Des Weiteren handelt es sich beim Großteil der gefundenen *ASXL1*-Mutationen um Nonsense-Mutationen, Deletionen oder Frameshift-Mutationen. Die Mutationen können zu einem Kettenabbruch in der Proteinbiosynthese führen, wodurch Gene ihre ursprüngliche Funktion verlieren. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden Nonsense-Mutationen (n = 3) und Deletionen (n = 2) identifiziert. Die in der Literatur am häufigsten beschriebene Mutation ist die Duplikation c.1934dupG, die den Frameshift p.Gly646Trpfs\*12 verursacht (Valikhani et al. 2017, Metzeler et al. 2011, Gelsi-Boyer et al. 2012, Boulton et al. 2010). Deren Existenz als somatische Mutation oder PCR-Artefakt ist jedoch umstritten (Abdel-Wahab et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde diese Mutation bei der CML im Kindesalter nicht nachgewiesen.

Die aktuelle Forschung strebt nach einem besseren Verständnis der molekularen Ereignisse, die die Progression der CML vorantreiben. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob es sich bei *BCR-ABL1*-unabhängigen Mutationen um primäre oder sekundäre Ereignisse handelt. In Verlaufsuntersuchungen einer Studie von Genovese et al. erwiesen sich somatische Mutationen in *ASXL1*, *DNMT3A* und *TET2* als Risikofaktor für das Auftreten hämato-onkologischer Erkrankungen. Somit könnten diese Mutationen ein frühes Ereignis in der Pathogenese solcher Erkrankungen darstellen (Genovese et al. 2014).

In der Literatur wird das Auftreten von *BCR-ABL1*-unabhängigen Mutationen bei Erwachsenen in unterschiedlichen Erkrankungsphasen beschrieben. Die *ASXL1*-Mutationen treten vor allem in der chronischen Phase (Boulton et al. 2010, Togasaki et al. 2017) und in der Blastenkrise (Boulton et al. 2010, Makishima et al. 2011) auf.

Da in vorliegender Arbeit *ASXL1*-Mutationen bei Erstdiagnose von pädiatrischen CML-Patienten in chronischer Phase nachgewiesen wurden, kann es sich hier durchaus um ein frühes Ereignis handeln. Es ist auch möglich, dass ein Ereignis wie eine Mutation in epigenetischen Regulatorgenen erst zur *BCR-ABL1*-Aberration und damit zum Ausbruch der Erkrankung führt. Diese Inhalte spiegeln sich in der Hypothese der Mehrschrittpathogenese wieder.

Um der Antwort auf diese Frage nach der klonalen Hierarchie ein Stück näher zu kommen, wurden in vorliegender Arbeit Klonalitätsanalysen an CML-Stammzellen durchgeführt. Aufgrund des limitierten Zellmaterials konnte dies nur von einem Patienten durchgeführt werden. Nach der Sanger-Sequenzierung des aus den Zellkolonien isolierten *ASXL1*-Gens zeigte sich, dass alle Mutationen als heterozygote Mutationen vorlagen. Dieses Ergebnis stimmt mit der Literatur überein, wo der Haploinsuffizienz eine Schlüsselfunktion in der Pathogenität der *ASXL1*-Mutation zugeschrieben wird (Gelsi-Boyer et al. 2012).

Die anschließende FISH-Analyse offenbarte, dass *ASXL1*-Mutation und *BCR-ABL1* auf demselben Zellklon liegen. Jedoch erwiesen sich auch Zellklone ohne *ASXL1*-Mutation als *BCR-ABL1*-positiv. Das bedeutet, dass das *BCR-ABL1*-Fusionsgen wahrscheinlich vor dem Auftreten der *ASXL1*-Mutation entstand. Aufgrund dieser Tatsachen wird die *ASXL1*-Mutation nicht als primäres, sondern eher als sekundäres Ereignis eingestuft. Da hier an nur einem Patienten Klonalitätsanalysen durchgeführt werden konnten, sind für die Validierung dieser Aussage Untersuchungen an größeren Kohorten notwendig.

Trotz der Einordnung als sekundäres Ereignis können die *ASXL1*-Mutationen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der CML im Kindesalter spielen. Für diese Behauptung spricht, dass *ASXL1*-Mutationen in anderen Erkrankungen meist in Koexistenz mit weiteren

Mutationen in epigenetischen Regulatorgenen sowie in Genen der Signaltransduktion und der Splicing Proteine auftreten (Abdel-Wahab et al. 2011, Rocquain et al. 2010), was gegenseitige Wechselbeziehungen dieser vermuten lässt. Bezüglich dieses Sachverhalts ist hier bei der CML im Kindesalter jedoch auffällig, dass ausschließlich *ASXL1*-Mutationen nachgewiesen werden konnten und andere Gene nicht betroffen waren.

Das *ASXL1*-Gen befindet sich auf Chromosom 20 (20q11) und stellt das menschliche Homolog zum Drosophila *Additional Sex Combs (Asx)*-Gen der Fruchtfliege dar. Es kodiert für ein Protein der Polycomb-Gruppe. Die Polycomb-Gruppe übt zusammen mit der Trithorax-Gruppe einen epigenetischen Einfluss sowohl auf die Aktivierung als auch auf die Repression der Transkription aus. In diesem Zusammenhang ist *ASXL1* gemeinsam mit dem *Polycomb repressive complex 2* (PRC2) an der Histon 3-Lysin 27-Trimethylierung beteiligt. Auch in der *ASXL1-BRCA1 associated protein 1* (BAP1) - Achse spielt *ASXL1* eine wichtige Rolle, indem sein Protein eine Untereinheit des Deubiquitinase-Komplexes mit BAP1 als katalytischem Partner darstellt. Damit wird die Regulation der Myelopoese beeinflusst (Abdel-Wahab und Dey 2013).

Die genauen Funktionen des Gens blieben lange unklar, doch neuere Studien zeigten außerdem, dass *ASXL1* auch mit dem Cohesin-Komplex in Wechselwirkung steht und somit eine Rolle bei der Regulation der Chromatidentrennung im Rahmen der Zellteilung der normalen Hämatopoese spielt (Li et al. 2017).

*De novo* Mutationen im *ASXL1*-Gen werden unter anderem als Ursache des sehr seltenen, kongenital auftretenden Bohring-Opitz-Syndroms angesehen, das mit Entwicklungsstörungen in verschiedenen Organsystemen einhergeht (Hoischen et al. 2011).

Somatische *ASXL1*-Mutationen werden häufig im Spektrum der myeloproliferativen und myelodysplastischen Erkrankungen bei erwachsenen Patienten gefunden. So konnten Gelsi-Boyer et al. in einer Studie von 2009 bei 11% der erwachsenen MDS-Patienten und bei 43% der erwachsenen Patienten mit chronischer myelomonozytärer Leukämie (CMML) erstmals *ASXL1*-Mutationen nachweisen (Gelsi-Boyer et al. 2009). In einer chinesischen Studie wurden *ASXL1*-Mutationen mit einer Prävalenz von 11,8% bei MDS-Patienten detektiert. In diese Studie wurden Patienten im Alter von 11 - 89 Jahren eingeschlossen (Wu et al. 2016). Auch bei AML-Patienten treten *ASXL1*-Mutationen auf. In einer Studie von Metzeler et al. lag die Prävalenz solcher Mutationen in erwachsenen AML-Patienten (18 - 83 Jahre) bei 10,4%. Dabei fiel auf, dass über 60 Jahre alte Patienten fünf mal häufiger betroffen waren als Patienten unter 60 Jahre (16,2% vs. 3,2%) (Metzeler et al. 2011). Übereinstimmend mit

diesem Sachverhalt legte auch die Forschergruppe um Liang die geringe Prävalenz von *ASXL1*-Mutationen bei AML-Patienten im Kindesalter (1,1%) dar (Liang et al. 2013).

Obwohl ein Vergleich zwischen AML und CML aufgrund der unterschiedlichen Pathogenese erschwert ist, stehen diese Erkenntnisse doch in deutlichem Kontrast zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit.

In einer Studie von Huether et al. wurden mehr als 1.000 pädiatrische Patienten mit unterschiedlichen onkologischen Erkrankungen auf somatische Mutationen in epigenetischen Regulatorgenen untersucht. Das Gen *ASXL1* befand sich auch bei pädiatrischen Krebspatienten unter den am häufigsten mutierten Genen. Die höchste Frequenz an mutierten epigenetischen Regulatorgenen hatten hierbei Kinder mit Hirntumoren und mit Leukämien (beides 30%) (Huether et al. 2014). Mutationen im *ASXL1*-Gen spielen also auch bei anderen onkologischen Erkrankungen im Kindesalter eine wichtige Rolle.

Im Durchschnitt haben Kinder mit onkologischen Erkrankungen insgesamt weniger Mutationen als erwachsene Patienten mit onkologischen Erkrankungen. Diese Aussage lässt sich auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit übertragen, denn alle untersuchten Kinder wiesen entweder eine oder keine Mutation auf.

Momentan ist nur wenig darüber bekannt, welche molekularen Mechanismen zur Progression der CML in die Blastenkrise führen. Höchstwahrscheinlich sind jedoch im späteren Krankheitsverlauf auftretende Mutationen beteiligt, die zu genomischer Instabilität führen und beispielsweise Tumorsuppressorgene unterdrücken. Grossmann et al. untersuchten den Mutationsstatus von elf Leukämie-assoziierten Genen in 39 CML-Patienten in der Blastenkrise. Dabei wiesen 76,9 % der Patienten Mutationen auf, das *ASXL1*-Gen war in 20,5% der Fälle mutiert. Interessanterweise wurden *ASXL1*-Mutationen ausschließlich im Verlauf von myeloischen Blastenkrisen gefunden (Grossmann et al. 2011). Makishima et al. untersuchten 54 CML-Patienten in chronischer Phase (n = 14), akzelerierter Phase (n = 14) und Blastenkrise (n = 26) auf Mutationen in den Genen *JAK2*, *CBL*, *CBLB*, *TET2*, *ASXL1* und *IDH1/2*. *ASXL1*-Mutationen konnten nur in Patienten nachgewiesen werden, die sich in der Blastenkrise befanden (Makishima et al. 2011). Bei Boulton et al. wurden in 53 Proben aus chronischer Phase (n = 32) und Blastenkrise (n = 21) von 41 Patienten sechs *ASXL1*-Mutationen identifiziert. Dabei betreffen jeweils drei Mutationen Probenmaterial der chronischen Phase und Probenmaterial der Blastenkrise (Boulton et al. 2010). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *ASXL1*-Mutationen sowohl in der chronischen Phase als auch in der Blastenkrise auftreten.

Im Rahmen von Untersuchungen bezüglich der Mutationskinetik bei TKI-Therapie wurde festgestellt, dass *ASXL1*-Mutationen bei Erreichen einer molekularen Remission nicht mehr nachgewiesen werden konnten (Togasaki et al. 2017, Schmidt et al. 2014). Die gleichen Beobachtungen wurden in hier vorliegender Arbeit gemacht. Nach Therapiebeginn mit TKI konnte die Mutation in der Verlaufskontrolle von Patient #3 nicht mehr nachgewiesen werden.

Durch intensive Forschung konnten die Auswirkungen und Einflüsse der *ASXL1*-Mutationen auf molekularbiologischer sowie klinischer Ebene genauer untersucht werden.

In Mausexperimenten zeigten Fisher et al., dass der Verlust von *ASXL1* alleine nicht zu myeloischen Erkrankungen führt (Fisher et al. 2010). Es ist aber durchaus vorstellbar, dass die *ASXL1*-Mutation mit anderen Defekten in gegenseitigen Wechselbeziehungen steht, und ein Zusammenspiel mit der *BCR-ABL1*-Mutation oder anderen Leukämie-assoziierten Mutationen zur Pathogenese der CML beiträgt.

Im Gegensatz dazu stellen Untersuchungen von Wang et al. eindrücklich dar, dass der Funktionsverlust von *ASXL1* bei Mäusen zu MDS-ähnlichen Erkrankungen führte und die Anzahl an hämatopoetischen Stammzellen reduziert wurde (Wang et al. 2014). Dies legt die Vermutung nahe, dass *ASXL1* als Tumorsuppressorgen fungiert und die Regulation der hämatopoetischen Stammzellen unterstützt. Einen weiteren Beweis für die Bedeutung des *ASXL1*-Gens im Rahmen der myeloischen Zelldifferenzierung lieferten Valletta et al. Sie korrigierten eine Nonsense-Mutation in *ASXL1* der Zelllinie KBM5 mittels CRISPR/Cas9 und beobachteten eine wiederhergestellte normale Proteinfunktion mit verbesserter Differenzierung myeloischer Zellen. Die alleinige Korrektur der Mutation verbesserte außerdem das Überleben von Mäusen, denen *ASXL1*-korrigierte KBM5-Zellen transplantiert wurden im Gegensatz zu mit nicht-*ASXL1*-korrigierten KBM5-Zellen transplantierten Mäusen (Valletta et al. 2015).

Die Arbeitsgruppe um Abdel-Wahab et al. zeigte, dass durch den Funktionsverlust von *ASXL1* die durch PRC2-vermittelte Histon 3-Lysin 27-Trimethylierung reduziert wird und dadurch unter anderem die Genexpression des posterioren HOXA-Clusters gestört wird. Dieser spielt eine wichtige Rolle in der hämatopoetischen Transformation. Zusammenfassend tragen *ASXL1*-Mutationen also durch Dysregulation des PRC2-vermittelten Gen-*Silencings* zur myeloischen Transformation bei (Abdel-Wahab et al. 2012). Im Zusammenhang mit der ASXL1-BAP1-Achse konnte gezeigt werden, dass durch Mutationen verkürzte ASXL1-Proteine dem ASXL1-BAP1-Komplex eine erhöhte Aktivität verleihen. Dies wiederum



sorgte in Zellkulturen für eine verstärkte Differenzierung der myeloischen Zellen (Balasubramani et al. 2015). Somit scheint die *ASXL1*-BAP1-Achse einen wichtigen Anteil an der Leukämogenese darzustellen (Dey et al. 2012).

Neuere Studien wiesen auf eine wichtige Funktion von *ASXL1* auch in der Erythropoese hin. Shi et al. bestätigten bei Ausschalten des *ASXL1*-Gens in CD34-positiven Zellen der Nabelschnur eine verringerte Erythropoese und eine beeinträchtigte Entkernung der Erythrozyten. Genauso wiesen Mäuse mit ausgeschaltetem *ASXL1*-Gen weniger Progenitorzellen in der Milz und einen höheren Anteil an Erythroblasten sowie eine eingeschränkte Entkernung der Erythrozyten im Knochenmark auf (Shi et al. 2016). Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten Hilgendorf et al. Das Ausschalten von *ASXL1* führte in CD34-positiven Zellen der Nabelschnur zu einer reduzierten Erythrozyten-Differenzierung und Entwicklung der Progenitorzellen. Der Grund dafür waren eine erhöhte Apoptose-Aktivität und eine verstärkte Ansammlung der Zellen im G1/G0-Stadium. Die Ergebnisse von Abdel-Wahab et al. bestätigend ging der Verlust von *ASXL1* mit einer ausbleibenden Histon 3-Lysin 27-Trimethylierung und einer verstärkten Expression der Zielgene in der erythroiden, nicht jedoch in der myeloiden Zellreihe einher (Hilgendorf et al. 2016). Die Ergebnisse dieser drei Forschungsgruppen unterstützen die These, dass das Ausschalten von *ASXL1* unter anderem die Entwicklung von Erythrozyten negativ beeinträchtigt.

Verschiedene Studien analysierten die Korrelation zwischen *ASXL1*-Mutationen in myeloischen Erkrankungen und deren klinischen Auswirkungen. So wurden MPNs (ohne CML) mit *ASXL1*-Mutationen mit schwereren Verläufen und einem geringeren Gesamtüberleben assoziiert (Brecqueville et al. 2012). Auch für CMML fand sich ein Zusammenhang zwischen *ASXL1*-Mutationen und schlechterer Prognose (Patnaik et al. 2016) sowie der akuten Transformation von CMML zu AML (Gelsi-Boyer et al. 2010). Beim MDS gingen *ASXL1*-Mutationen mit einer kürzeren Zeitspanne zur Progression in die AML einher und machen die Mutation damit zu einem Prognosefaktor (Thol et al. 2011). Bei der AML zeigten vor allem die Patienten mit einer *de novo* AML-Erkrankung und *ASXL1*-Mutationen ein schlechteres Ansprechen auf die Chemotherapie und ein kürzeres Gesamtüberleben (Alvarez Argote und Dasanu 2017), dies traf ebenfalls auf pädiatrische und erwachsene AML-Patienten mit unauffälliger Zytogenetik zu (Brown et al. 2017).

Bezüglich CML ist die Studienlage zum Mutationsstatus von *ASXL1* begrenzt. Die klinischen Verläufe bei *ASXL1*-Mutationen in der chronischen Phase und in der Blastenkrise wurden von Makishima et al. untersucht. Gegenteilig zu den bisher aufgeführten Zusammenhängen

konnten keine Unterschiede bezüglich des Gesamtüberlebens von erwachsenen CML-Patienten mit *ASXL1*-Mutationen gegenüber denen ohne Mutation festgestellt werden (Makishima et al. 2011). Ebenso konnte bei Grossmann et al. bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Mutationsstatus und klinischem Verlauf bei CML-Patienten keine signifikante Assoziation festgestellt werden, wobei sich diese Studie wie bereits erwähnt auf *ASXL1*-Mutationen in der Blastenkrise bezogen hat (Grossmann et al. 2011). Auch in der Kohorte der vorliegenden Arbeit wurde beim Vergleich kein signifikanter Unterschied im Überleben der CML-Patienten mit und ohne *ASXL1*-Mutation in der chronischen Phase festgestellt. Allerdings basieren diese Ergebnisse nicht auf dem aktuellen therapeutischen Vorgehen, da das hier untersuchte Patientenkollektiv hauptsächlich aus den 1990er Jahren stammte und mittels allogener Stammzelltransplantation behandelt wurde. Dennoch könnten die aufgelisteten Erkenntnisse ein weiteres Indiz dafür sein, dass sich die Bedeutung von *ASXL1*-Mutationen in der CML von der in anderen myeloischen Erkrankungen unterscheidet. Auch als Prognosefaktor könnten *ASXL1*-Mutationen bei Patienten dienen, die sich resistent gegenüber der TKI-Therapie zeigen. Vor allem bei Patienten ohne Mutationen in der *ABL1*-Kinase-Domäne scheinen *DNMT3A*- und *ASXL1*-Mutationen zur TKI-Resistenz beizutragen (Kim et al. 2017).

Die Entwicklung des NGS ermöglichte eine verbesserte molekulargenetische Charakterisierung hämatologischer Erkrankungen. So konnte in den letzten Jahren eine Vielzahl an Mutationen in hämatologischen Erkrankungen identifiziert werden. Meist beschränken sich die gefundenen Mutationen nicht auf eine Entität, sondern sind in verschiedenen hämatologischen Neoplasien parallel zu finden.

Für das Jena-Leukämie-Panel wurden nach Literaturrecherche 30 Gene ausgewählt, die im Formenkreis myeloischer Neoplasien am häufigsten Mutationen aufweisen. Mit der verwendeten Methode konnten diese Gene simultan und mit hoher Sensitivität auf Mutationen analysiert werden.

Aktuell orientiert sich die Forschung in Richtung des *Whole Exome Sequencings* (WES) und *Whole Genome Sequencings* (WGS). Aufgrund der sinkenden Kosten könnte das WGS zukünftig ein wichtiges Diagnosewerkzeug für die personalisierte Medizin darstellen. Detektierte Mutationen könnten nicht nur die Diagnosestellung erleichtern, sondern auch auf den Schweregrad der Krankheitsverläufe sowie verändertes Medikamentenansprechen hinweisen.

Obwohl *ASXL1*-Mutationen in myeloischen Erkrankungen seit einigen Jahren Thema der aktuellen onkologischen Forschung sind, bleiben viele Fragen unbeantwortet. Für die konkrete Funktion des Gens *ASXL1* muss weitere Forschung auf molekularer Ebene betrieben werden.

Über die genaue Ursache der Mutationsentstehung im Gen *ASXL1* lässt sich in dieser Arbeit keine abschließende Aussage machen. Es ist jedoch bekannt, dass die *BCR-ABL1*-Aberration in der Zelle verschiedene Signalwege aktiviert. Diese können zum Ausbleiben der Apoptose einer Zelle führen oder eine von Wachstumsfaktoren unabhängige Proliferation der Zelle verursachen. Ebenso können sie zu einer Veränderung der Zelladhäsionsmechanismen führen oder eine Pharmakoresistenz induzieren. Die *BCR-ABL1*-Translokation führt somit zu einer Genominstabilität, die mit einer Dysregulation von Onkogenen einhergeht. Im Rahmen dieser können weitere chromosomale und molekulare Aberrationen, wie die hier vorliegenden *ASXL1*-Mutationen, entstehen.

Ein weiterer wichtiger, bisher wenig beleuchteter Punkt ist das Zusammenspiel von *ASXL1*-Mutationen mit anderen Leukämie-assoziierten Mutationen, wie z.B. der *JAK2 V617F*-Mutation in MPN sowie der Treibermutation *BCR-ABL1* innerhalb der CML.

Um die Prävalenz von *ASXL1*-Mutationen in CML im Erwachsenen- sowie Kindesalter definieren zu können, müssen größere Kohorten analysiert werden. Die in dieser Arbeit gefundene Prävalenz ist aufgrund der geringen Anzahl untersuchter Patienten nicht repräsentativ.

Außerdem könnte ein Wissensgewinn über die Kinetik von *ASXL1*-Mutationen unter Therapie und im weiteren Verlauf der Erkrankung für das Verständnis und die Bedeutung der Mutation wegweisend sein. Eine solche Verlaufskontrolle war in vorliegender Kohorte nur bei einem *ASXL1*-positiven Patienten möglich. Die fünf anderen *ASXL1*-positiven Patienten wurden vor der Imatinib-Ära diagnostiziert und dementsprechend mit Stammzelltransplantationen behandelt. Drei der Patienten sind mittlerweile verstorben. Aus demselben Grund konnten die gefundenen Mutationen bei nur drei Patienten am Mundabstrich verifiziert werden. Auch um eine verlässliche Aussage zum Zusammenhang zwischen dem Überleben der CML-Patienten und vorliegenden *ASXL1*-Mutationen zu erhalten, müssen Untersuchungen in größeren Kohorten und unter aktuellen Therapiestandards mit TKI durchgeführt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *ASXL1*-Mutationen auch als sekundäres Ereignis die Pathogenese der CML beeinflussen, zur Progression der Erkrankung beitragen und einen wichtigen prognostischen Faktor darstellen könnten. Diese Zusammenhänge wurden bisher

nicht erforscht, sodass weitere Studien bezüglich der Auswirkungen von *ASXL1*-Mutationen in der CML im Kindesalter und der Korrelation der Mutationen mit dem klinischen Verlauf wünschenswert wären.

## 6 Schlussfolgerung und Ausblick

Im Gegensatz zur CML im Erwachsenenalter ist die CML im Kindesalter eine wenig erforschte Erkrankung und obwohl Unterschiede zur adulten Form vorliegen, werden viele diagnostische und therapeutische Standards aus der Erwachsenenmedizin übernommen.

In der vorliegenden Arbeit konnten erstmals häufige *ASXLI*-Mutationen bei der CML im Kindesalter und jungen Erwachsenen nachgewiesen werden. Damit leistet sie einen wichtigen Wissensgewinn zur molekularen Pathogenese in diesem Patientenkollektiv.

Aufgrund des kleinen Patientenkollektivs konnten keine genaueren Aussagen zur Korrelation von *ASXLI*-Mutationen mit klinischen Verläufen bzw. der Prognose getroffen werden. Dies sollte in zukünftigen, größer angelegten Studien untersucht werden. Bedingt durch das seltene Auftreten der CML im Kindesalter sind große Patientenkohorten nur bei multizentrischen Studien möglich. Gleichzeitig stellt ein Pool an genetischen Informationen über *BCR-ABL1*-unabhängige Mutationen bei CML im Kindesalter ein begrenztes, und daher sehr wertvolles Gut dar. Insofern wäre ein Screening auf *ASXLI*-Mutationen bei Erstdiagnose von CML im Kindesalter sinnvoll.

Weiterhin ist die Studienlage zur Kinetik von *ASXLI*-Mutationen bei der CML im Verlauf und unter Therapie sehr lückenhaft, sodass sich diesbezüglich weitere Analysen anschließen sollten. Möglicherweise könnte die *ASXLI*-Mutation neben dem *BCR-ABL1*-Transkript als Marker für das Erkrankungsstadium bzw. Therapieansprechen sowie als Prognosefaktor fungieren.

Intensivere Forschungsbemühungen könnten weitere Informationen darüber preisgeben, welche Rolle die *ASXLI*-Mutation als primäres oder sekundäres molekulares Ereignis im Rahmen der Pathogenese und der Progression der Erkrankung spielt.

Es ist von fundamentalem Wert, die Pathogenese der Erkrankung aufzuklären und zu verstehen. Nur so könnten *BCR-ABL1*-unabhängige Mutationen therapeutisch berücksichtigt werden und für die personalisierte Medizin Medikamente entwickelt werden, die optimaler Weise am Ursprung der Erkrankung ansetzen. Derartige Entwicklungen könnten in Zukunft Gesamtüberleben, Prognose und Lebensqualität betroffener Patienten mit CML im Kindesalter verbessern.

## 7 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Abdel-Wahab O, Dey A. 2013. The ASXL-BAP1 axis: new factors in myelopoiesis, cancer and epigenetics. *Leukemia*, 27 (1):10-15.
- Abdel-Wahab O, Kilpivaara O, Patel J, Busque L, Levine RL. 2010. The most commonly reported variant in ASXL1 (c.1934dupG;p.Gly646TrpfsX12) is not a somatic alteration. *Leukemia*, 24 (9):1656-1657.
- Abdel-Wahab O, Pardanani A, Patel J, Wadleigh M, Lasho T, Heguy A, Beran M, Gilliland DG, Levine RL, Tefferi A. 2011. Concomitant analysis of EZH2 and ASXL1 mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*, 25 (7):1200-1202.
- Abdel-Wahab O, Adli M, LaFave LM, Gao J, Hricik T, Shih AH, Pandey S, Patel JP, Chung YR, Koche R, Perna F, Zhao X, Taylor JE, Park CY, Carroll M, Melnick A, Nimer SD, Jaffe JD, Aifantis I, Bernstein BE, Levine RL. 2012. ASXL1 mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression. *Cancer Cell*, 22 (2):180-193.
- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. 2010. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*, 7 (4):248-249.
- Alvarez Argote J, Dasanu CA. 2017. ASXL1 mutations in myeloid neoplasms: pathogenetic considerations, impact on clinical outcomes and survival. *Curr Med Res Opin*:1-7.
- Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F, Apperley J, Cervantes F, Cortes J, Deininger M, Gratwohl A, Guilhot F, Horowitz M, Hughes T, Kantarjian H, Larson R, Niederwieser D, Silver R, Hehlmann R, European L. 2006. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, 108 (6):1809-1820.
- Balasubramani A, Larjo A, Bassein JA, Chang X, Hastie RB, Togher SM, Lahdesmaki H, Rao A. 2015. Cancer-associated ASXL1 mutations may act as gain-of-function mutations of the ASXL1-BAP1 complex. *Nat Commun*, 6:7307.
- Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, Kvasnicka HM, Vannucchi AM, Guglielmelli P, Orazi A, Tefferi A. 2018. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. *Blood Cancer J*, 8 (2):15.
- Biernaux C, Loos M, Sels A, Huez G, Stryckmans P. 1995. Detection of major bcr-abl gene expression at a very low level in blood cells of some healthy individuals. *Blood*, 86 (8):3118-3122.
- Bose S, Deininger M, Gora-Tybor J, Goldman JM, Melo JV. 1998. The presence of typical and atypical BCR-ABL fusion genes in leukocytes of normal individuals: biologic significance and implications for the assessment of minimal residual disease. *Blood*, 92 (9):3362-3367.
- Boultonwood J, Perry J, Zaman R, Fernandez-Santamaria C, Littlewood T, Kusec R, Pellagatti A, Wang L, Clark RE, Wainscoat JS. 2010. High-density single nucleotide polymorphism array analysis and ASXL1 gene mutation screening in chronic myeloid leukemia during disease progression. *Leukemia*, 24 (6):1139-1145.

- Brecqueville M, Rey J, Bertucci F, Coppin E, Finetti P, Carbuccia N, Cervera N, Gelsi-Boyer V, Arnoulet C, Gisserot O, Verrot D, Slama B, Vey N, Mozziconacci MJ, Birnbaum D, Murati A. 2012. Mutation analysis of ASXL1, CBL, DNMT3A, IDH1, IDH2, JAK2, MPL, NF1, SF3B1, SUZ12, and TET2 in myeloproliferative neoplasms. *Genes Chromosomes Cancer*, 51 (8):743-755.
- Brown FC, Cifani P, Drill E, He J, Still E, Zhong S, Balasubramanian S, Pavlick D, Yilmazel B, Knapp KM, Alonzo TA, Meshinchi S, Stone RM, Kornblau SM, Marcucci G, Gamis AS, Byrd JC, Gonen M, Levine RL, Kentsis A. 2017. Genomics of primary chemoresistance and remission induction failure in paediatric and adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, 176 (1):86-91.
- Burchert A, Muller MC, Kostrewa P, Erben P, Bostel T, Liebler S, Hehlmann R, Neubauer A, Hochhaus A. 2010. Sustained molecular response with interferon alfa maintenance after induction therapy with imatinib plus interferon alfa in patients with chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol*, 28 (8):1429-1435.
- Carella AM, Podesta M, Frassoni F, Raffo MR, Pollicardo N, Pungolino E, Vimercati R, Sessarego M, Parodi C, Rabitti C, et al. 1993. Collection of 'normal' blood repopulating cells during early hemopoietic recovery after intensive conventional chemotherapy in chronic myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplant*, 12 (3):267-271.
- Castagnetti F, Gugliotta G, Baccarani M, Breccia M, Specchia G, Levato L, Abruzzese E, Rossi G, Iurlo A, Martino B, Pregno P, Stagno F, Cuneo A, Bonifacio M, Gobbi M, Russo D, Gozzini A, Tiribelli M, de Vivo A, Alimena G, Cavo M, Martinelli G, Pane F, Saglio G, Rosti G, Party GCW. 2015. Differences among young adults, adults and elderly chronic myeloid leukemia patients. *Ann Oncol*, 26 (1):185-192.
- Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. 2012. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One*, 7 (10):e46688.
- Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. 1990. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science*, 247 (4944):824-830.
- Dey A, Seshasayee D, Noubade R, French DM, Liu J, Chaurushiya MS, Kirkpatrick DS, Pham VC, Lill JR, Bakalarski CE, Wu J, Phu L, Katavolos P, LaFave LM, Abdel-Wahab O, Modrusan Z, Seshagiri S, Dong K, Lin Z, Balazs M, Suriben R, Newton K, Hymowitz S, Garcia-Manero G, Martin F, Levine RL, Dixit VM. 2012. Loss of the tumor suppressor BAP1 causes myeloid transformation. *Science*, 337 (6101):1541-1546.
- Fialkow PJ, Martin PJ, Najfeld V, Penfold GK, Jacobson RJ, Hansen JA. 1981. Evidence for a multistep pathogenesis of chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 58 (1):158-163.
- Fisher CL, Pineault N, Brookes C, Helgason CD, Ohta H, Bodner C, Hess JL, Humphries RK, Brock HW. 2010. Loss-of-function Additional sex combs like 1 mutations disrupt hematopoiesis but do not cause severe myelodysplasia or leukemia. *Blood*, 115 (1):38-46.
- Gelsi-Boyer V, Brecqueville M, Devillier R, Murati A, Mozziconacci MJ, Birnbaum D. 2012. Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *J Hematol Oncol*, 5:12.
- Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adelaide J, Bonansea J, Cervera N, Carbuccia N, Lagarde A, Prebet T, Nezri M, Sainty D, Olschwang S, Xerri L, Chaffanet M, Mozziconacci MJ, Vey N, Birnbaum D. 2009. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 145 (6):788-800.

- Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Roquain J, Adelaide J, Carbuccia N, Esterni B, Finetti P, Murati A, Arnoulet C, Zerazhi H, Fezoui H, Tadriz Z, Nezri M, Chaffanet M, Mozziconacci MJ, Vey N, Birnbaum D. 2010. ASXL1 mutation is associated with poor prognosis and acute transformation in chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 151 (4):365-375.
- Genovese G, Kahler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, Chambert K, Mick E, Neale BM, Fromer M, Purcell SM, Svantesson O, Landen M, Hoglund M, Lehmann S, Gabriel SB, Moran JL, Lander ES, Sullivan PF, Sklar P, Gronberg H, Hultman CM, McCarroll SA. 2014. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med*, 371 (26):2477-2487.
- Gratwohl A, Brand R, Apperley J, Crawley C, Ruutu T, Corradini P, Carreras E, Devergie A, Guglielmi C, Kolb HJ, Niederwieser D. 2006. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia in Europe 2006: transplant activity, long-term data and current results. An analysis by the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Haematologica*, 91 (4):513-521.
- Grossmann V, Kohlmann A, Zenger M, Schindela S, Eder C, Weissmann S, Schnittger S, Kern W, Muller MC, Hochhaus A, Haferlach T, Haferlach C. 2011. A deep-sequencing study of chronic myeloid leukemia patients in blast crisis (BC-CML) detects mutations in 76.9% of cases. *Leukemia*, 25 (3):557-560.
- Gurrea Salas D, Glauche I, Tauer JT, Thiede C, Suttrop M. 2015. Can prognostic scoring systems for chronic myeloid leukemia as established in adults be applied to pediatric patients? *Ann Hematol*, 94 (8):1363-1371.
- Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M, European L. 2007. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*, 370 (9584):342-350.
- Hijiya N, Schultz KR, Metzler M, Millot F, Suttrop M. 2016. Pediatric chronic myeloid leukemia is a unique disease that requires a different approach. *Blood*, 127 (4):392-399.
- Hilgendorf S, Folkerts H, Schuringa JJ, Vellenga E. 2016. Loss of ASXL1 triggers an apoptotic response in human hematopoietic stem and progenitor cells. *Exp Hematol*, 44 (12):1188-1196.e1186.
- Hochhaus A, Larson RA, Guilhot F, Radich JP, Branford S, Hughes TP, Baccarani M, Deininger MW, Cervantes F, Fujihara S, Ortmann CE, Menssen HD, Kantarjian H, O'Brien SG, Druker BJ, Investigators I. 2017. Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*, 376 (10):917-927.
- Hoischen A, van Bon BW, Rodriguez-Santiago B, Gilissen C, Vissers LE, de Vries P, Janssen I, van Lier B, Hastings R, Smithson SF, Newbury-Ecob R, Kjaergaard S, Goodship J, McGowan R, Bartholdi D, Rauch A, Peippo M, Cobben JM, Wieczorek D, Gillessen-Kaesbach G, Veltman JA, Brunner HG, de Vries BB. 2011. De novo nonsense mutations in ASXL1 cause Bohring-Opitz syndrome. *Nat Genet*, 43 (8):729-731.
- Huether R, Dong L, Chen X, Wu G, Parker M, Wei L, Ma J, Edmonson MN, Hedlund EK, Rusch MC, Shurtleff SA, Mulder HL, Boggs K, Vadordaria B, Cheng J, Yergeau D, Song G, Becksfort J, Lemmon G, Weber C, Cai Z, Dang J, Walsh M, Gedman AL, Faber Z, Easton J, Gruber T, Kriwacki RW, Partridge JF, Ding L, Wilson RK, Mardis ER, Mullighan CG, Gilbertson RJ, Baker SJ, Zambetti G, Ellison DW, Zhang J, Downing JR. 2014. The landscape of somatic mutations in epigenetic regulators across 1,000 paediatric cancer genomes. *Nat Commun*, 5:3630.
- Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, Lindsley RC, Mermel CH, Burt N, Chavez A, Higgins JM, Moltchanov V, Kuo FC, Kluk MJ,



- Henderson B, Kinnunen L, Koistinen HA, Ladenvall C, Getz G, Correa A, Banahan BF, Gabriel S, Kathiresan S, Stringham HM, McCarthy MI, Boehnke M, Tuomilehto J, Haiman C, Groop L, Atzmon G, Wilson JG, Neuberg D, Altshuler D, Ebert BL. 2014. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med*, 371 (26):2488-2498.
- Jin MW, Xu SM, An Q, Wang P. 2016. A review of risk factors for childhood leukemia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 20 (18):3760-3764.
- Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, Score J, Seear R, Chase AJ, Grand FH, White H, Zoi C, Loukopoulos D, Terpos E, Vervessou EC, Schultheis B, Emig M, Ernst T, Lengfelder E, Hehlmann R, Hochhaus A, Oscier D, Silver RT, Reiter A, Cross NC. 2005. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood*, 106 (6):2162-2168.
- Kalmanti L, Saussele S, Lauseker M, Proetel U, Muller MC, Hanfstein B, Schreiber A, Fabarius A, Pfirrmann M, Schnittger S, Dengler J, Falge C, Kanz L, Neubauer A, Stegelmann F, Pfreundschuh M, Waller CF, Spiekermann K, Krause SW, Heim D, Nerl C, Hossfeld DK, Kolb HJ, Hochhaus A, Hasford J, Hehlmann R, German Chronic Myeloid Leukemia Study G, Schweizerische Arbeitsgemeinschaft für Klinische K. 2014. Younger patients with chronic myeloid leukemia do well in spite of poor prognostic indicators: results from the randomized CML study IV. *Ann Hematol*, 93 (1):71-80.
- Kim T, Tyndel MS, Zhang Z, Ahn J, Choi S, Szardenings M, Lipton JH, Kim HJ, Kim Dong Hwan D. 2017. Exome sequencing reveals DNMT3A and ASXL1 variants associate with progression of chronic myeloid leukemia after tyrosine kinase inhibitor therapy. *Leuk Res*, 59:142-148.
- Krumbholz M, Karl M, Tauer JT, Thiede C, Rascher W, Suttorp M, Metzler M. 2012. Genomic BCR-ABL1 breakpoints in pediatric chronic myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, 51 (11):1045-1053.
- Kurosawa H, Tanizawa A, Tono C, Watanabe A, Shima H, Ito M, Yuza Y, Hotta N, Muramatsu H, Okada M, Kajiwarra R, Moriya Saito A, Mizutani S, Adachi S, Horibe K, Ishii E, Shimada H. 2016. Leukostasis in Children and Adolescents with Chronic Myeloid Leukemia: Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Pediatr Blood Cancer*, 63 (3):406-411.
- Li Z, Zhang P, Yan A, Guo Z, Ban Y, Li J, Chen S, Yang H, He Y, Li J, Guo Y, Zhang W, Hajiramezanali E, An H, Fajardo D, Harbour JW, Ruan Y, Nimer SD, Yu P, Chen X, Xu M, Yang FC. 2017. ASXL1 interacts with the cohesin complex to maintain chromatid separation and gene expression for normal hematopoiesis. *Sci Adv*, 3 (1):e1601602.
- Liang DC, Liu HC, Yang CP, Jaing TH, Hung IJ, Yeh TC, Chen SH, Hou JY, Huang YJ, Shih YS, Huang YH, Lin TH, Shih LY. 2013. Cooperating gene mutations in childhood acute myeloid leukemia with special reference on mutations of ASXL1, TET2, IDH1, IDH2, and DNMT3A. *Blood*, 121 (15):2988-2995.
- Mahon FX, Rea D, Guilhot J, Guilhot F, Huguet F, Nicolini F, Legros L, Charbonnier A, Guerci A, Varet B, Etienne G, Reiffers J, Rousselot P. 2010. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol*, 11 (11):1029-1035.
- Makishima H, Jankowska AM, McDevitt MA, O'Keefe C, Dujardin S, Cazzolli H, Przychodzen B, Prince C, Nicoll J, Siddaiah H, Shaik M, Szpurka H, Hsi E, Advani A, Paquette R, Maciejewski JP. 2011. CBL, CBLB, TET2, ASXL1, and IDH1/2

- mutations and additional chromosomal aberrations constitute molecular events in chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 117 (21):e198-206.
- Mariner PD, Walters RD, Espinoza CA, Drullinger LF, Wagner SD, Kugel JF, Goodrich JA. 2008. Human Alu RNA is a modular transacting repressor of mRNA transcription during heat shock. *Mol Cell*, 29 (4):499-509.
- Metzeler KH, Becker H, Maharry K, Radmacher MD, Kohlschmidt J, Mrozek K, Nicolet D, Whitman SP, Wu YZ, Schwind S, Powell BL, Carter TH, Wetzler M, Moore JO, Kolitz JE, Baer MR, Carroll AJ, Larson RA, Caligiuri MA, Marcucci G, Bloomfield CD. 2011. ASXL1 mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN Favorable genetic category. *Blood*, 118 (26):6920-6929.
- Millot F, Traore P, Guilhot J, Nelken B, Leblanc T, Leverger G, Plantaz D, Bertrand Y, Bordigoni P, Guilhot F. 2005. Clinical and biological features at diagnosis in 40 children with chronic myeloid leukemia. *Pediatrics*, 116 (1):140-143.
- Millot F, Brice P, Philippe N, Thyss A, Demeoq F, Wetterwald M, Boccara JF, Vilque JP, Guyotat D, Guilhot J, Guilhot F. 2002. Alpha-interferon in combination with cytarabine in children with Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*, 24 (1):18-22.
- Millot F, Guilhot J, Baruchel A, Petit A, Bertrand Y, Mazingue F, Lutz P, Verite C, Berthou C, Galambrun C, Sirvent N, Yakouben K, Schmitt C, Gandemer V, Reguerre Y, Couillault G, Mechinaud F, Cayuela JM. 2014a. Impact of early molecular response in children with chronic myeloid leukemia treated in the French Glivec phase 4 study. *Blood*, 124 (15):2408-2410.
- Millot F, Guilhot J, Baruchel A, Petit A, Leblanc T, Bertrand Y, Mazingue F, Lutz P, Verite C, Berthou C, Galambrun C, Nicolas S, Yacouben K, Chastagner P, Gandemer V, Reguerre Y, Couillault G, Khalifeh T, Rialland F. 2014b. Growth deceleration in children treated with imatinib for chronic myeloid leukaemia. *Eur J Cancer*, 50 (18):3206-3211.
- Millot F, Baruchel A, Guilhot J, Petit A, Leblanc T, Bertrand Y, Mazingue F, Lutz P, Verite C, Berthou C, Galambrun C, Bernard F, Yacouben K, Bordigoni P, Edan C, Reguerre Y, Couillault G, Mechinaud F, Cayuela JM, Guilhot F. 2011. Imatinib is effective in children with previously untreated chronic myelogenous leukemia in early chronic phase: results of the French national phase IV trial. *J Clin Oncol*, 29 (20):2827-2832.
- Narayanan KR, Bansal D, Walia R, Sachdeva N, Bhansali A, Varma N, Marwaha RK. 2013. Growth failure in children with chronic myeloid leukemia receiving imatinib is due to disruption of GH/IGF-1 axis. *Pediatr Blood Cancer*, 60 (7):1148-1153.
- Nowell PC, Hungerford DA. 1960. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst*, 25:85-109.
- O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, Cornelissen JJ, Fischer T, Hochhaus A, Hughes T, Lechner K, Nielsen JL, Rousselot P, Reiffers J, Saglio G, Shepherd J, Simonsson B, Gratwohl A, Goldman JM, Kantarjian H, Taylor K, Verhoef G, Bolton AE, Capdeville R, Druker BJ, Investigators I. 2003. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 348 (11):994-1004.
- Patnaik MM, Lasho TL, Vijayvargiya P, Finke CM, Hanson CA, Ketterling RP, Gangat N, Tefferi A. 2016. Prognostic interaction between ASXL1 and TET2 mutations in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood Cancer J*, 6:e385.
- Pemmaraju N, Kantarjian H, Shan J, Jabbour E, Quintas-Cardama A, Verstovsek S, Ravandi F, Wierda W, O'Brien S, Cortes J. 2012. Analysis of outcomes in adolescents and

- young adults with chronic myelogenous leukemia treated with upfront tyrosine kinase inhibitor therapy. *Haematologica*, 97 (7):1029-1035.
- Pye SM, Cortes J, Ault P, Hatfield A, Kantarjian H, Pilot R, Rosti G, Apperley JF. 2008. The effects of imatinib on pregnancy outcome. *Blood*, 111 (12):5505-5508.
- Rinke J, Schafer V, Schmidt M, Ziermann J, Kohlmann A, Hochhaus A, Ernst T. 2013. Genotyping of 25 leukemia-associated genes in a single work flow by next-generation sequencing technology with low amounts of input template DNA. *Clin Chem*, 59 (8):1238-1250.
- Rocquain J, Carbuccion N, Trouplin V, Raynaud S, Murati A, Nezri M, Tadriz Z, Olschwang S, Vey N, Birnbaum D, Gelsi-Boyer V, Mozziconacci MJ. 2010. Combined mutations of ASXL1, CBL, FLT3, IDH1, IDH2, JAK2, KRAS, NPM1, NRAS, RUNX1, TET2 and WT1 genes in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *BMC Cancer*, 10:401.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74 (12):5463-5467.
- Schafer V, Ernst J, Rinke J, Winkelmann N, Beck JF, Hochhaus A, Gruhn B, Ernst T. 2016. EZH2 mutations and promoter hypermethylation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol*, 142 (7):1641-1650.
- Schmidt M, Rinke J, Schafer V, Schnittger S, Kohlmann A, Obstfelder E, Kunert C, Ziermann J, Winkelmann N, Eigendorff E, Haferlach T, Haferlach C, Hochhaus A, Ernst T. 2014. Molecular-defined clonal evolution in patients with chronic myeloid leukemia independent of the BCR-ABL status. *Leukemia*, 28 (12):2292-2299.
- Shendure JA, Porreca GJ, Church GM, Gardner AF, Hendrickson CL, Kieleczawa J, Slatko BE. 2011. Overview of DNA sequencing strategies. *Curr Protoc Mol Biol*, Chapter 7:Unit7 1.
- Shi H, Yamamoto S, Sheng M, Bai J, Zhang P, Chen R, Chen S, Shi L, Abdel-Wahab O, Xu M, Zhou Y, Yang FC. 2016. ASXL1 plays an important role in erythropoiesis. *Sci Rep*, 6:28789.
- Suttorp M, Millot F. 2010. Treatment of pediatric chronic myeloid leukemia in the year 2010: use of tyrosine kinase inhibitors and stem-cell transplantation. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2010:368-376.
- Thol F, Friesen I, Damm F, Yun H, Weissinger EM, Krauter J, Wagner K, Chaturvedi A, Sharma A, Wichmann M, Gohring G, Schumann C, Bug G, Ottmann O, Hofmann WK, Schlegelberger B, Heuser M, Ganser A. 2011. Prognostic significance of ASXL1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*, 29 (18):2499-2506.
- Togasaki E, Takeda J, Yoshida K, Shiozawa Y, Takeuchi M, Oshima M, Saraya A, Iwama A, Yokote K, Sakaida E, Hirase C, Takeshita A, Imai K, Okumura H, Morishita Y, Usui N, Takahashi N, Fujisawa S, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Kiyoi H, Ohnishi K, Ohtake S, Asou N, Kobayashi Y, Miyazaki Y, Miyano S, Ogawa S, Matsumura I, Nakaseko C, Naoe T. 2017. Frequent somatic mutations in epigenetic regulators in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *Blood Cancer J*, 7 (4):e559.
- Ulmer A, Tabea Tauer J, Glauche I, Jung R, Suttorp M. 2013. TK inhibitor treatment disrupts growth hormone axis: clinical observations in children with CML and experimental data from a juvenile animal model. *Klin Padiatr*, 225 (3):120-126.
- Valikhani A, Poopak B, Ferdowsi S, Azizi Tabesh G, Ghaffari SH, Saraf Kazeruoni E, Rezaei N, Farshchi A, Amirizadeh N. 2017. ASXL1 and JAK2V617F gene mutation screening in Iranian patients with chronic myeloid leukemia. *Asia Pac J Clin Oncol*, 13 (2):e41-e47.

- Valletta S, Dolatshad H, Bartenstein M, Yip BH, Bello E, Gordon S, Yu Y, Shaw J, Roy S, Scifo L, Schuh A, Pellagatti A, Fulga TA, Verma A, Boultonwood J. 2015. ASXL1 mutation correction by CRISPR/Cas9 restores gene function in leukemia cells and increases survival in mouse xenografts. *Oncotarget*, 6 (42):44061-44071.
- Vandyke K, Fitter S, Dewar AL, Hughes TP, Zannettino AC. 2010. Dysregulation of bone remodeling by imatinib mesylate. *Blood*, 115 (4):766-774.
- Vandyke K, Fitter S, Drew J, Fukumoto S, Schultz CG, Sims NA, Yeung DT, Hughes TP, Zannettino AC. 2013. Prospective histomorphometric and DXA evaluation of bone remodeling in imatinib-treated CML patients: evidence for site-specific skeletal effects. *J Clin Endocrinol Metab*, 98 (1):67-76.
- Wang J, Li Z, He Y, Pan F, Chen S, Rhodes S, Nguyen L, Yuan J, Jiang L, Yang X, Weeks O, Liu Z, Zhou J, Ni H, Cai CL, Xu M, Yang FC. 2014. Loss of Asxl1 leads to myelodysplastic syndrome-like disease in mice. *Blood*, 123 (4):541-553.
- Wang Y, Huang J, Rong L, Wu P, Kang M, Zhang X, Lu Q, Fang Y. 2016. Impact of age on the survival of pediatric leukemia: an analysis of 15083 children in the SEER database. *Oncotarget*, 7 (50):83767-83774.
- Wu L, Song L, Xu L, Chang C, Xu F, Wu D, He Q, Su J, Zhou L, Xiao C, Zhang Z, Zhao Y, Chen S, Li X. 2016. Genetic landscape of recurrent ASXL1, U2AF1, SF3B1, SRSF2, and EZH2 mutations in 304 Chinese patients with myelodysplastic syndromes. *Tumour Biol*, 37 (4):4633-4640.
- Xie M, Lu C, Wang J, McLellan MD, Johnson KJ, Wendl MC, McMichael JF, Schmidt HK, Yellapantula V, Miller CA, Ozenberger BA, Welch JS, Link DC, Walter MJ, Mardis ER, Diersio JF, Chen F, Wilson RK, Ley TJ, Ding L. 2014. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med*, 20 (12):1472-1478.

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Patientenkohorte .....	12
Tabelle 2: Chemikalien mit Hersteller .....	15
Tabelle 3: Kits mit Hersteller .....	17
Tabelle 4: Geräte mit Hersteller .....	18
Tabelle 5: Ausgewählte Gene .....	21
Tabelle 6: Protokoll für Fast Start High Fidelity PCR.....	22
Tabelle 7: Programmablauf für Fast Start High Fidelity PCR.....	22
Tabelle 8: Protokoll für GCrich PCR.....	23
Tabelle 9: Programmablauf für GCrich PCR.....	23
Tabelle 10: Programm zur Aufreinigung der PCR-Produkte .....	28
Tabelle 11: Herstellung des Mastermix .....	28
Tabelle 12: Programm zur Sequenzier-PCR.....	28
Tabelle 13: Übersicht über mediane und mittlere Reads der 21 Läufe.....	31
Tabelle 14: Sensitivitätskontrollen. ....	32
Tabelle 15: <i>JAK2</i> -V617F-Mutationsanteile. ....	33
Tabelle 16: Mutationen mit funktioneller Auswirkung. ....	35
Tabelle 17: SNPs und stille Mutationen. ....	38

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Sequenz der Forward und Reverse Primer zur Herstellung der Amplicons.....	17
Abbildung 2: Gelelektrophorese der Fast Start Gene. ....	30
Abbildung 3: Darstellung der Patientennnummern und <i>reads</i> pro Lauf.....	31
Abbildung 4: GM-CSF-Kolonie der MNC von Patient #9.....	46
Abbildung 5: Darstellung der Ergebnisse von Sanger-Sequenzierung und FISH-Analyse.....	48
Abbildung 6: FISH-Analyse und Sanger-Sequenzierung.....	48
Abbildung 7: Mutationskinetik unter TKI .....	49
Abbildung 8a: Kaplan-Meier-Überlebenskurve aller Patienten. ....	50
Abbildung 8b: Kaplan-Meier-Überlebenskurve der mittels allo SCT behandelten Patienten.	51

## Primerverzeichnis

Primer	SEQUENZ	Größe	PCR	Poo- ling
ASXL1_12_1F ASXL1_12_1R	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG AGTCCCTAGGTCAGATCACCC CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CACCATCACCCTGCTGC	344	FS	1,5
ASXL1_12_2F ASXL1_12_2R	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG ATGAGGGAGGTGGCAGAG CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG ACTGAGGTTTGGGAGGACAG	346	FS	1,0
ASXL1_12_3F ASXL1_12_3R	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG AGGAGATGCCTCCCAACTC CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TGTTCTGCAGGCAATCAGTC	350	FS	1,0
ASXL1_12_4F ASXL1_12_4R	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG ATGAGGAGCAAGGACCCAC CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TGGTTTGGGCTGTTTCACTAC	341	FS	1,0
ASXL1_12_5F ASXL1_12_5R	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GAAAACCTTGAAAACCAAGGCTC CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TGAGGACTCAGTGCTTCAGAG	338	FS	1,0
ASXL1_12_6F ASXL1_12_6R	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TCACTCTGGACTGTGCCATC CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG AGTACTGGCCAGCAGTAGGG	384	FS	1,0
ASXL1_12_7F ASXL1_12_7R	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CAAGGTGAATGGTGACATGC CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TAAAGATCCCATGCGTAGCG	325	FS	1,0
ASXL1_12_8F ASXL1_12_8R	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG ACCAGCCCACGATGACAG CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CGGACTTCCTTCTGATCTTCAC	372	FS	1,0
ASXL1_12_9F ASXL1_12_9R	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CAAGGCAGTCCCAAGTTTGTG CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG AAGGGTTGCAGCCACATTC	331	FS	1,0
ASXL1_12_10F ASXL1_12_10R	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TTGGTCCAGAGCAGACAGG CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GGCATTTCCTTAAGAGGAC	302	FS	1,0
ASXL1_12_11F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GCAGCGTCAAGAATGAGAAG	323	FS	1,0

<b>ASXL1_12_11R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CACCACACTTCCAGCAAGG			
<b>ASXL1_12_12F</b> <b>ASXL1_12_12R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CAGCATCAAGCAGGCATTT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CAATGTTTCCCATGGCCATA	350	FS	1,0
<b>BRAF_11F</b> <b>BRAF_11R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG AAGGGGATCTCTTCCTGTATCC CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG AGTTTATTGATGCGAACAGTGA	344	FS	1,0
<b>BRAF_15F</b> <b>BRAF_15R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TGCTTGCTCTGATAGGAAAATG CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TGATTTTTGTGAATACTGGGAAC	300	FS	1,0
<b>CALR_9F</b> <b>CALR_9R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG AAGGCCCTGAGGTGTGTG CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG AACCAAAATCCACCCCAAAT	367	FS	1,0
<b>CBL_8F</b> <b>CBL_8R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG AGGACCCAGACTAGATGCTTTC CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GGCCACCCCTTGATCAGTA	387	FS	1,2
<b>CBL_9F</b> <b>CBL_9R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TGGGGTTAGGTTTAACTTTTACTTT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CTCACAATGGATTTTGCCAGT	361	FS	1,2
<b>CSF3R_14F</b> <b>CSF3R_14R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CTATCCTCAGTTCCCCACA CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GACCAGGGGATTCAAAGTCA	352	FS	1,0
<b>CSF3R_17_1F</b> <b>CSF3R_17_1R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CTGGGGCAGACATCTGAAAT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG AGTGGAGTCACAGCGGAGAT	333	FS	1,0
<b>CSF3R_17_2F</b> <b>CSF3R_17_2R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GACCCAAGAGCAGTTTCCAC CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TATGGACCCTCCCCTCTTCT	392	FS	1,0
<b>DNMT3A_2F</b> <b>DNMT3A_2R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG ATCCTCTTCTCTCCCCACA CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TGCGGTCATGCACTCAGTAT	370	GC	1,2
<b>DNMT3A_3F</b> <b>DNMT3A_3R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GGTGGGGGCATATTACACAG CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TCCCTGCAGGACATACATCA	349	FS	1,0
<b>DNMT3A_4F</b> <b>DNMT3A_4R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG AAACAGGCTAAGCCCACTGA CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG AGCCAAGTCCCTGACTCTCA	399	FS	1,0



<b>DNMT3A_5F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GAACAGCTAAACGGCCAGAG	309	FS	1,0
<b>DNMT3A_5R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CACTTCCTCTCCTTCCCCACA			
<b>DNMT3A_6F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CATTGTGTTTGAGGCGAGTG	381	FS	1,0
<b>DNMT3A_6R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GCTGAAGGAGCAGATGAACC			
<b>DNMT3A_7F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GTCCCCTTGAGTGTGAGGTG	353	FS	2,0
<b>DNMT3A_7R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GAGGAGCTGGCAGTGGAAAG			
<b>DNMT3A_8F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GCCTCGTGACCACTGTGTAA	307	FS	1,0
<b>DNMT3A_8R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CACTTCCATCACCCCAATTC			
<b>DNMT3A_9F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CTCCTCTTTGCATCGGGTAA	335	FS	1,0
<b>DNMT3A_9R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG ACCTGCACTCCAACCTCCAG			
<b>DNMT3A_10F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CCTGTGCCACCCTCACTACT	337	FS	1,0
<b>DNMT3A_10R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CTCCCTAAGCATGGCTTTCC			
<b>DNMT3A_11-12F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GGAGTTTCCTGTCAGCCTGT	366	FS	1,0
<b>DNMT3A_11-12R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG AGAGTTCCCAAGCAACAAAC			
<b>DNMT3A_13F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GTCACAGTGCCTCCCTTTTC	331	FS	1,0
<b>DNMT3A_13R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG ACCCTGTACATGCCAGAAG			
<b>DNMT3A_14F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CAGGGCTTAGGCTCTGTGAG	304	FS	1,0
<b>DNMT3A_14R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GGTCTGTGGGGAAGGGAG			
<b>DNMT3A_15F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TCCATTCCAGGTAGCACACC	318	FS	1,0
<b>DNMT3A_15R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CCCACAACCAAGGCTCAG			
<b>DNMT3A_16F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CAGGGTGTGTGGGTCTAGGA	319	FS	1,0
<b>DNMT3A_16R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG AAGCTTCCCCTTTGGGATAA			
<b>DNMT3A_17F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GACTTGGGCCTACAGCTGAC	321	FS	1,0
<b>DNMT3A_17R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CCTCCAGGTGCTGAGTGTG			
<b>DNMT3A_18F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CAACTTGGTCCCGTTCTTGT	360	FS	1,0

<b>DNMT3A_18R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CCAGGGCAGAAATATCCAAG			
<b>DNMT3A_19F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG ATTCCCGATGACCCTGTCTT	339	FS	1,0
<b>DNMT3A_19R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GCTCCACAATGCAGATGAGA			
<b>DNMT3A_20F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CAGCTTGTGGAATGTGGCTA	333	FS	1,0
<b>DNMT3A_20R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CACTATGGGTCATCCCACCT			
<b>DNMT3A_21F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CTGCAGTGTGTGTTCTGTGTG	315	FS	1,0
<b>DNMT3A_21R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CTCATCCTGCCCTTCCTTCT			
<b>DNMT3A_22F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CTCACTCAGAGCCATACCC	372	FS	1,0
<b>DNMT3A_22R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CAGGACGTTTGTGGAAAACA			
<b>DNMT3A_23F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TCCTGCTGTGTGGTTAGACG	373	FS	1,0
<b>DNMT3A_23R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CGCCTCTGTGGTTTTTGT			
<b>ETV6_1F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GGGAGAGGAAAGGAAAGTGG	355	GC	1,5
<b>ETV6_1R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG AATTGTGACCGGCATTTCAT			
<b>ETV6_2F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CCAAGGCTAGGCATCTGAAA	358	FS	1,0
<b>ETV6_2R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TCAATCCTCTGTCCCTCTCG			
<b>ETV6_3F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TCCAGCTGTCTAACTGACAAGAC	301	FS	1,0
<b>ETV6_3R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GAGGGGTGTTAAAGACCAACC			
<b>ETV6_4F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TTTCAAGTGCTGCATTCTGTG	347	FS	1,0
<b>ETV6_4R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TTTGTCTAAACCTCAGGCAAGA			
<b>ETV6_5_1F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GAGTTTCCTGTCCTGCCAAC	393	FS	1,0
<b>ETV6_5_1R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG ATCACGCGTGTGCTCTCC			
<b>ETV6_5_2F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG AACCACCAGGAGTCCTACCC	391	FS	1,0
<b>ETV6_5_2R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GGGGAGAGTGGGACTTTGTC			
<b>ETV6_6F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TAGGCAGAAGCAGTTGCTGG	317	FS	1,0
<b>ETV6_6R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CGATTATCCTCCAATCCAGG			

<b>ETV6_7F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GCAGGTAGCTTCCCAAAGT	364	FS	1,0
<b>ETV6_7R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GCAATGATTGGCTTTGGGTA			
<b>ETV6_8F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CTCGGGGTTTCAGTAGCTCTC	354	FS	1,0
<b>ETV6_8R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG ATTTCTGGGTCGCTTCCTTT			
<b>EZH2_2F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG AGTTTGCTGCGGATTAAACA	357	FS	1,0
<b>EZH2_2R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CAGATCAAGAACCTAAGCTTCCA			
<b>EZH2_3F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GATTTTAAACCTGCTTTACAGGTGT	312	FS	1,5
<b>EZH2_3R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CCCTGAGGTCAATGATTTCC			
<b>EZH2_4F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TTGGGTAGGCAGCATCTCTT	392	FS	1,0
<b>EZH2_4R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GAGTAATACTGCACAGGCCTTAAAA			
<b>EZH2_5F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG AAATCTGGAGAACTGGGTAAAGAC	316	FS	1,0
<b>EZH2_5R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TCATGCCCTATATGCTTCATAAAC			
<b>EZH2_6F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG AGGCTATGCCTGTTTTGTCC	332	FS	1,0
<b>EZH2_6R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG AAAAGAGAAAGAAGAACTAAGCC C			
<b>EZH2_7F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CTGACTGGCATTCCACAGAC	380	FS	1,0
<b>EZH2_7R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG AAGTGTAGTGGCTCATCCGC			
<b>EZH2_8F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CATCAAAAGTAACACATGGAAACC	348	FS	1,0
<b>EZH2_8R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TTGTAATAAATGATAGCACTCTCCA AG			
<b>EZH2_9F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG ATGGTTGGAGGAGGAGGAAT	349	FS	1,0
<b>EZH2_9R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG ACCTCCACCAAAGTGCAAAG			
<b>EZH2_10F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TTCTCTTCCATCAAAATGAGTTTTAG	360	FS	1,0
<b>EZH2_10R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TCCTCACAACACGAACCTTTCAC			
<b>EZH2_11F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GAGTTGTCCTCATCTTTTCGC	362	FS	1,0
<b>EZH2_11R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CCAAGAATTTCTTTGTTTGGAC			

<b>EZH2_12F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TAGGGACAGCGATGTGTGTT	319	FS	1,0
<b>EZH2_12R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CCAACAACAGCCCTTAGGAA			
<b>EZH2_13F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TCTTGGCTTTAACGCATTCC	300	FS	1,0
<b>EZH2_13R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CGTCCTCCATTCAAATTGGT			
<b>EZH2_14F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CTTGGGGGTGGGAGAGTATT	341	FS	1,0
<b>EZH2_14R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GCAATTGCATCAAAGCAACA			
<b>EZH2_15F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GAGAGTCAGTGAGATGCCAG	371	FS	1,0
<b>EZH2_15R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TTTGCCCCAGCTAAATCATC			
<b>EZH2_16F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TCAGCAGCTTTCACGTTGAC	372	FS	1,0
<b>EZH2_16R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TGGCAATTCAATTTCCAATCA			
<b>EZH2_17F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CAGACCGAATGGGAAAGAGA	344	FS	1,0
<b>EZH2_17R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CCTCCTTCTGGTACCTCAC			
<b>EZH2_18F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG AGGCAAACCCTGAAGAACTG	332	FS	1,0
<b>EZH2_18R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CACACTGGTGTGAGTGAGCAT			
<b>EZH2_19F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TGGAACCTCCCTTTTCAGTCC	342	FS	1,0
<b>EZH2_19R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CCACTAATGCTCATGGCAA			
<b>EZH2_20F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CTTCAGCAGGCTTTGTTGTG	330	FS	1,0
<b>EZH2_20R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CACTTTGCAGCTGGTGAGAA			
<b>FLT3_20F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TCCATCACCGGTACCTCCTA	356	FS	1,0
<b>FLT3_20R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GCAGACTGCTGTGAGGGTTT			
<b>IDH1_4F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CCATTTGTCTGAAAACTTTGCT	366	FS	1,0
<b>IDH1_4R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GCAAAATCACATTATTGCCAAC			
<b>IDH2_4F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG AATTTTAGGACCCCCGTCTG	325	FS	1,5
<b>IDH2_4R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CTAGGCGAGGAGCTCCAGT			
<b>JAK2_12F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CTCCTCTTTGGAGCAATTCA	351	FS	1,0

<b>JAK2_12R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CACAAGGTTGGCATATTTTTCA			
<b>JAK2_14F</b> <b>JAK2_14R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TGCTGAAAGTAGGAGAAAGTGCAT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TACAGTGTTCAGTTTCAAAAA	342	FS	1,5
<b>KIT_8F</b> <b>KIT_8R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG AAAGCCTTTCTGGGTGGAC CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG AATTGCAGTCCTTCCCCTCT	365	FS	1,0
<b>KIT_17F</b> <b>KIT_17R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TGAACATCATTCAAGGCGTA CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TGCAGGACTGTCAAGCAGAG	331	FS	1,0
<b>KRAS_2F</b> <b>KRAS_2R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CGTCTGCAGTCAACTGGAAT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG AGAATGGTCCTGCACCAGTAA	339	FS	1,0
<b>KRAS_3F</b> <b>KRAS_3R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TGCAGTGTAAATAATCCAGACTGTG CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TGCATGGCATTAGCAAAGAC	300	FS	1,0
<b>LNK_2_1F</b> <b>LNK_2_1R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GGTGTGTAATGGGGCCTACA CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CCTGTGTCCCGGTAGTCG	379	GC	1,5
<b>LNK_2_2F</b> <b>LNK_2_2R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CTGCAGTTCACCGACCTCTT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CTCCAGGGCAGGAACCTTCT	365	GC	6,0
<b>LNK_2_3F</b> <b>LNK_2_3R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CGGAGAGGCTGCTGAGAC CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TTGCACTCGGCCTAAAAGTT	398	GC	2,5
<b>MPL_10F</b> <b>MPL_10R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CCGAAGTCTGACCCTTTTTG CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GCGGTATAGTGGGCGTGTTA	320	FS	1,0
<b>NOTCH1_25_1F</b> <b>NOTCH1_25_1R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CGACACCGTCCTGTCTTCC CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG AGCTCGCACGCCTCCT	368	GC	2,0
<b>NOTCH1_25_2F</b> <b>NOTCH1_25_2R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CAAATTCAACGGGCTCTTGT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CTCCCTCAGCCCCATGA	365	GC	1,0
<b>NOTCH1_26_1F</b> <b>NOTCH1_26_1R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GCCAGCATGCAGTTCTAAGG CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CGCAGGAAGTGGAAGGAG	331	GC	1,0

<b>NOTCH1_26_2F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CTGGTGGTGGTGGTGTCTG	341	GC	1,0
<b>NOTCH1_26_2R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GAGAGTTGCGGGGATTGAC			
<b>NOTCH1_27F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CTGACTGTGGCGTCATGG	359	GC	1,0
<b>NOTCH1_27R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG ACACCCGTGGGTAGCAACT			
<b>NOTCH1_28F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GTAGCCGCTGCCTGATGTC	343	GC	1,0
<b>NOTCH1_28R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG AGACTCCCGGTGAGGATGC			
<b>NOTCH1_29F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GAGCTCGCTCAGCCTCAC	355	GC	2,0
<b>NOTCH1_29R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CAGTCGGCGTCAACCTCAC			
<b>NOTCH1_30F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GCCCTGACAGGCTCTGC	334	GC	2,0
<b>NOTCH1_30R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG ACACCCCAAGGATGAAAGC			
<b>NOTCH1_31F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GCCCTCCAGACTGAGCAC	364	GC	1,0
<b>NOTCH1_31R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GGCAGGTGGGCACACAG			
<b>NOTCH1_32F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GTCCAGGCGTTCGTTCTG	347	GC	1,0
<b>NOTCH1_32R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG ACTTGCCTGCGTGAAAGAAG			
<b>NOTCH1_33F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CCGTAGATGACCTGGGTGAG	338	GC	1,0
<b>NOTCH1_33R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CGAGACCCTGTGGGTCAG			
<b>NOTCH1_34_1F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG ACTGCTGCTTCCTCTGGTGA	358	GC	1,0
<b>NOTCH1_34_1R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CTTGAGGCTGCCCAGGTA			
<b>NOTCH1_34_2F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG AGGCTGCTGGACGAGTACAA	357	GC	1,0
<b>NOTCH1_34_2R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CACGGACGGAGACTGCTG			
<b>NOTCH1_34_3F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CCATGGCTACCTGTCAGACG	351	GC	1,0
<b>NOTCH1_34_3R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TATTGGTTCGGCACCATGC			
<b>NOTCH1_34_4F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GAATGGTCAATGCGAGTGG	359	GC	1,0
<b>NOTCH1_34_4R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CTGAGCTCACGCCAAGGT			
<b>NOTCH1_34_5F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TGCAGCCACAAAACCTTACAGA	333	GC	1,0

<b>NOTCH1_34_5R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TGTCCACAGGCGAGGAGTAG			
<b>NOTCH1_34_6F</b> <b>NOTCH1_34_6R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CTGCCATCCTCGCTGGT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG ATCCACAGAGCGCACACA	335	GC	1,0
<b>NPM1F</b> <b>NPM1R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TGTCTATGAAGTGTGTTGGTTCCT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TTTTGTCTCCCCACCATTTC	372	FS	1,5
<b>NRAS_2F</b> <b>NRAS_2R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GGCCGATATTAATCCGGTGT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TGGGTAAAGATGATCCGACAA	345	FS	1,0
<b>NRAS_3F</b> <b>NRAS_3R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CCCTCCCTGCCCCCTTAC CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CCCTAGATTCTCAATGTCAAACAA	357	FS	1,0
<b>p53_2-3F</b> <b>p53_2-3R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TCAGACACTGGCATGGTGT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CAGCCCAACCCTTGTCCT	366	GC	1,0
<b>p53_4F</b> <b>p53_4R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CTGACTGCTCTTTTCACCCA CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TGAAGTCTCATGGAAGCCAG	344	FS	1,0
<b>p53_5F</b> <b>p53_5R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CACTTGTGCCCTGACTTTCA CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CACTCGGATAAGATGCTGAGG	343	GC	1,0
<b>p53_6F</b> <b>p53_6R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CAGATAGCGATGGTGAGCAG CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TTGCACATCTCATGGGGTTA	335	FS	1,0
<b>p53_7F</b> <b>p53_7R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CCTGCTTGCCACAGGTCT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TGAGTGGGAGCAGTAAGGAGA	331	FS	1,0
<b>p53_8F</b> <b>p53_8R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TGGGACCTCTTAACCTGTGG CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TAACTGCACCCTTGGTCTCC	351	FS	1,0
<b>p53_9F</b> <b>p53_9R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG AAGCAAGCAGGACAAGAAGC CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TGGTATAAGTTGGTGTCTGAAGTT	342	FS	1,0
<b>p53_10F</b> <b>p53_10R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GCTGTATAGGTACTTGAAGTGCAG CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CTGCCTTTGACCATGAAGG	349	FS	1,0

<b>p53_11F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CCTTAGGCCCTTCAAAGCAT	362	FS	1,0
<b>p53_11R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CCACAACAAAACACCAGTGC			
<b>RUNX1_3F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GCTGTTTGCAGGGTCTTAA	340	GC	1,0
<b>RUNX1_3R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CCTGTCCTCCCACCACCCTC			
<b>RUNX1_4F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CATTGCTATTCTCTGCAACC	336	FS	1,0
<b>RUNX1_4R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TGCCATGAAACGTGTTTCAAGC			
<b>RUNX1_5F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG ATTCCGGGAGTGTTGTCAA	335	FS	1,0
<b>RUNX1_5R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GGTTGAACCCAAGGAATCTG			
<b>RUNX1_6F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TGATCTCTTCCCTCCCTCCT	348	FS	1,0
<b>RUNX1_6R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CAGTTGGTCTGGGAAGGTGT			
<b>RUNX1_7F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG ACCCTGGTACATAGGCCACA	369	FS	1,0
<b>RUNX1_7R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CCAACCTCCTTCATGCACCTC			
<b>RUNX1_8_1F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CGCAACCTCCTACTCACTTCCG	333	GC	1,0
<b>RUNX1_8_1R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG ATGGAGAACTGGTAGGAGCC			
<b>RUNX1_8_2F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GTTCCAAGCCAGCTCGCCC	341	GC	2,0
<b>RUNX1_8_2R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GGGCTTGTCGCGAACAGGAGG			
<b>SETBP1_4F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG ATGCACCCACTTTCAACACA	326	FS	1,0
<b>SETBP1_4R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TTCTCCGCTTGGTCAGAAAGT			
<b>SF3B1_12F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GAAACCACACCTATTACTCTGCTC	393	FS	1,0
<b>SF3B1_12R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CCTCTTACGGCAAAGATGACA			
<b>SF3B1_13F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TCTTAAACAGTTCGTCCCTTGA	329	FS	1,0
<b>SF3B1_13R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG AAGAAAGGACAGTCATGAGTTGG			
<b>SF3B1_14F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TTGATTATGGAAAGAAATGGTTGA	399	FS	1,0
<b>SF3B1_14R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG AAGACCCTGTCTCCTAAAGAAAA			
<b>SF3B1_15F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TGCTGACAGGCTATGGTTCA	332	FS	1,0



SF3B1_15R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TCAAAAGGTAATTGGTGGATTT			
SF3B1_16F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GTATCCGCCAACACAGAGGA	319	FS	1,0
SF3B1_16R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TGTTAGAACCATGAAACATATCCA			
SRSF2_1_1F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG AAGGCAACTGCCTGAGAGG	315	GC	1,5
SRSF2_1_1R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG ATGGCATCCATAGCGTCCT			
SRSF2_1_2F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CCTCCCTCAAGGTGGACAA	398	GC	4,0
SRSF2_1_2R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CGCGGACCTTTGTGAGGT			
SRSF2_2F	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TCGGATTCCCAGACATTACC	370	GC	1,0
SRSF2_2R	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CTGGAATTAACCCCGCTGT			
STAG2_3F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GCAGTCAAATGCAAGGGAAT	345	FS	1,0
STAG2_3R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG AATGCATTCCCCATTTTGTG			
STAG2_4F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TTGTGTGTTTGGTAACGTGCT	370	FS	1,0
STAG2_4R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CACCCCCTTAAAAAGCCATT			
STAG2_5F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GGACACCACAAAGAGGCTGT	368	FS	1,0
STAG2_5R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG ACAAATGAACTGGGAAGAACAAC			
STAG2_6F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TTGTTTTACTGAATTCGATTCTATTT	344	FS	1,5
STAG2_6R	T CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TTAGGTGGAACAACGAAGTGA			
STAG2_7F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TGATGGTTGAAGAAGTATGCCTTT	317	FS	2,0
STAG2_7R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG ATTACAGGCATGAGCCACCA			
STAG2_8F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TCATGCATTCTAAATGAAATTGCT	386	FS	1,0
STAG2_8R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GATGGGGGAGTGTCTCTTAG			
STAG2_9F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GGCCATTGTGAGGATTAGGA	397	FS	1,0
STAG2_9R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CCAAGTTGGTCACACAATAGCC			
STAG2_10F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CCCCAAAATACTGGGGAAT	370	FS	1,5
STAG2_10R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG			

	TGGGAAACACCAAACCTCACA			
<b>STAG2_11F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	398	FS	1,0
<b>STAG2_11R</b>	AGGCCCATGCTTCATTTCTA CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG ATAAAGGGGAGGCTTCCAGA			
<b>STAG2_12-13F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	399	FS	5,0
<b>STAG2_12-13R</b>	TTTTAATGCATTGTCTCATCTTTTT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CCTAGATGAGTCTGAACCAAATACT C			
<b>STAG2_14F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	300	FS	1,0
<b>STAG2_14R</b>	AGGACGTTACTAAAAGCACCTGTT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG AAAGGAAAAAGTAAAATGTGAAAG C			
<b>STAG2_15F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	342	FS	1,0
<b>STAG2_15R</b>	GCAATTATTTGCGTGGTGTG CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TGCCTCATTTTAACCCCTTTT			
<b>STAG2_16F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	356	FS	1,0
<b>STAG2_16R</b>	TGCTGTTTGAGAGTTTGTAGATGA CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TGAAAACAAAACCTATGCACGAAG			
<b>STAG2_17F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	379	FS	6,0
<b>STAG2_17R</b>	TGGGATGCTGAGGGTTTTAG CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TTGTTTCATGGCTAAAATGGAA			
<b>STAG2_18-19F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	398	FS	2,0
<b>STAG2_18-19R</b>	TGCTAATGGGCTTAATAAATACAGA A CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TGAAGTGAATAATTTTTCTTAAAGG TT			
<b>STAG2_20F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	341	FS	1,0
<b>STAG2_20R</b>	TTTCCATGGTGGTATGGTCA CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG ACTGCAGTAGAGGGGCTCAA			
<b>STAG2_21F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	340	FS	1,0
<b>STAG2_21R</b>	CCCAGCCATATTGCCTTAAA CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CCCACAACGACAACAACAAA			
<b>STAG2_22-23F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	398	FS	4,0
<b>STAG2_22-23R</b>	CAATTGTCATTAGGCTTAGCTTTTT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TGTGTGAGTTTGCTGAAAACAGT			
<b>STAG2_24F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	379	FS	1,0
<b>STAG2_24R</b>	GACAAACCGTCTCTTTGTTTTCA CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CAAGATATTTCTGCTTTGCTCAATC			
<b>STAG2_25F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	354	FS	1,0

<b>STAG2_25R</b>	GGCAGTTAGTGAGAAACCTTGG CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CCTGTGTTTCACGTTTTTAAGGA			
<b>STAG2_26F</b> <b>STAG2_26R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TGTTTTTCCCTTTTCAAATTCTCTT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GGCAGCCATGCATAAAAACT	319	FS	1,0
<b>STAG2_27F</b> <b>STAG2_27R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG AACATTCTTTCTGCCTTTGAA CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TTGCACACTTTGCCCAATTT	334	FS	1,0
<b>STAG2_28F</b> <b>STAG2_28R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TGCACTTTTGGTCATTTGCAT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TTCCAAATGAAAGGGCTAGATTT	388	FS	1,0
<b>STAG2_29F</b> <b>STAG2_29R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TGCACATTCTCACACTTTACAACC CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TTGCCCTTAAGAATCCCAAAA	338	FS	1,0
<b>STAG2_30F</b> <b>STAG2_30R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TGCCTATGCTCGCACAATA CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TGAACCTTAATGACAATTCAGTTGG	373	FS	1,0
<b>STAG2_31F</b> <b>STAG2_31R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TCCTGTGACTTGTCATGTGGA CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CTGCGTGCTTCAAGGAGAAT	400	FS	1,0
<b>STAG2_32F</b> <b>STAG2_32R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG AGCCACATACTGCTGCCTAGA CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GGATCTACCACCTTCACCAACC	392	FS	1,0
<b>STAG2_33F</b> <b>STAG2_33R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CCCGGCTGATAATTTTCCAT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG AGTATGCTGCCCCAGGTCTT	320	FS	1,0
<b>STAG2_34F</b> <b>STAG2_34R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG AGAGGGGAAGTTTTCAAAGTGG CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CCCCTCAATGCACTTGATCT	309	FS	1,0
<b>TET2_3_1F</b> <b>TET2_3_1R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG ATTCAACTAGAGGGCAGCCTTG CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG ACTGTGCGTTTTATTCTCCAT	338	FS	1,0
<b>TET2_3_2F</b> <b>TET2_3_2R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CACAAGAAAGTAGAGGGTATTCC CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG AATTAGCACTTTTCCCCTCCTG	339	FS	1,0
<b>TET2_3_3F</b> <b>TET2_3_3R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CACATAACTGCAGTGGGCCTG CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG	341	FS	1,0

	GTTAGAGGTCTGTGCGGAATTG			
<b>TET2_3_4F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	340	FS	1,0
<b>TET2_3_4R</b>	CCTGTGAGATCACTCACCCATC CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TTTGTGTTTAAATACCGTTCAGAGC			
<b>TET2_3_5F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	346	GC	1,0
<b>TET2_3_5R</b>	AATTCTGTTCAGGTTCCAGCAG CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG ATGGATTAGGACTCTGGGAAGG			
<b>TET2_3_6F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	349	FS	1,0
<b>TET2_3_6R</b>	GGGAAGTGAAAATAGAGGGTAAAC CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CCTGGTTTCAGATAGTGCTGTG			
<b>TET2_3_7F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	340	FS	1,0
<b>TET2_3_7R</b>	GATTCTGAAGGGTCGAGACAAG CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CTGGAGATGTTGGTCCACTGTA			
<b>TET2_3_8F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	352	FS	1,0
<b>TET2_3_8R</b>	AAGGCAAGCTTACACCCAGA CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GGATGGTTGTGTTTGTGCTG			
<b>TET2_3_9F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	379	FS	1,0
<b>TET2_3_9R</b>	GCACTTGAATCAACAGGCTTC CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TGCACTTGATTTTCATGGTCTG			
<b>TET2_3_10F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	300	FS	1,0
<b>TET2_3_10R</b>	CAAAATCAAGCGAGTTCGAG CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GTTGTGACTTCTGCTCCTGTTC			
<b>TET2_3_11F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	300	FS	1,0
<b>TET2_3_11R</b>	ATAATGTGATCCCAAAGCAAGA CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TTTGGGGTTGCTGTGTTTG			
<b>TET2_3_12F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	362	FS	1,0
<b>TET2_3_12R</b>	CCCAGAAGGACACTCAAAA CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG ACTGGCCCTGACATTTC AAC			
<b>TET2_3_13F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	347	FS	1,0
<b>TET2_3_13R</b>	CCACCTGCAAGCTGTGATAA CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TGAGTCTTGACAGGTGTATCCAA			
<b>TET2_3_14F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	354	FS	1,0
<b>TET2_3_14R</b>	CCCAGCTTTAGAGCAGCAAA CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TTTCAACAAGACACAAGCATCG			
<b>TET2_4F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	361	FS	1,0
<b>TET2_4R</b>	CCTTAATGTGTAGTTGGGGGTTA CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TTGTGACTCTCTGGTGAATAGCA			
<b>TET2_5F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	314	FS	1,0

<b>TET2_5RR</b>	CGTTCATTTCTCAGGATGTGG CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GGCATGAGTCTTTGATCTGG			
<b>TET2_6F</b> <b>TET2_6R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG AGTGACCCTTGTTTTGTTTTGG CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG ACCAAAGATTGGGCTTTCCTAT	336	FS	1,0
<b>TET2_7F</b> <b>TET2_7R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TCAGCTGCACAGCCTATATAATG CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TCTACAGTTTGGGAAAACTTTGAT	337	FS	1,0
<b>TET2_8F</b> <b>TET2_8R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TTGTGTTTGGGATTCAAAATGT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TGCAGTGGTTTCAACAATTAAGA	331	FS	1,0
<b>TET2_9F</b> <b>TET2_9R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TTCGCATTACACACACTTTT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TTTGCTCCTCATTTGCCTTC	336	FS	1,0
<b>TET2_10_1F</b> <b>TET2_10_1R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TCAACTAGGCCACCAACACA CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GTTTCCTTTGTTCGGCAAGTC	336	FS	1,0
<b>TET2_10_2F</b> <b>TET2_10_2R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TGCCATTCAAGTACTGAGTTCT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG ATCTGTGCAGCAAATCACCA	379	FS	1,0
<b>TET2_11_1F</b> <b>TET2_11_1R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG AAAGATACTGTTTCTGTTCTCTCTT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CAGCTTGAGATGAGGTGGAATA	315	FS	1,0
<b>TET2_11_2F</b> <b>TET2_11_2R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CACTTCAGATATCTATGGAAGCAC CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG ATTTTGGTTTCCATAACCTAAGTATT	349	FS	1,0
<b>TET2_11_3F</b> <b>TET2_11_3R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG AGCCAAGGTTTGGAAATAGCC CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GGGCATGAAGAGAGCTGTTG	300	FS	1,0
<b>TET2_11_4F</b> <b>TET2_11_4R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TCTCACATAATCCATAACTACAGTG C CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG AATGTCAGGATCCAGAAAGCTC	300	FS	1,0
<b>TET2_11_5F</b> <b>TET2_11_5R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GCAGAGGACAACGATGAGGT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG ATGGGATTTCTGAGGCACAT	318	FS	1,0
<b>TET2_11_6F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG AAGCCAAAATGGCTGAAAAAG	300	FS	1,0

<b>TET2_11_6R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TTGTGGTCTTTTCAAGTGAGGT			
<b>U2AF1_2F</b> <b>U2AF1_2R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TGCTGCTGACATATTCCATGT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG AGTCGATCACCTGCCTCACT	324	FS	1,0
<b>U2AF1_6F</b> <b>U2AF1_6R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG ATTAAAGCGTGGATGGCAAG CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CTCTGGAAATGGGCTTCAAA	324	FS	1,0
<b>UTX_1F</b> <b>UTX_1R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TAAAGTTGGTGTGCTGGTCC CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GAGAGCGGCTACTGCCC	317	GC	2,0
<b>UTX_2F</b> <b>UTX_2R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CTCGGTTTGGCGCTCTTC CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GAAAAGAGCGATTTCGCAAG	367	GC	2,0
<b>UTX_3F</b> <b>UTX_3R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TGCATTATCTTGGGGAGGAA CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GAACATGCAGGTGGTTTTCA	382	FS	1,0
<b>UTX_4F</b> <b>UTX_4R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GGTGTGGTGGGAATCTTGTT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GGAGAGTCATAACAAGACAGCACA	323	FS	1,0
<b>UTX_5F</b> <b>UTX_5R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TCAGGGCTGGAATACCTCTC CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CAAGCACAAACAAAACAAGCA	330	FS	1,0
<b>UTX_6F</b> <b>UTX_6R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG AAGAATTCATGCACGTGTTAAAAA CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TTGATAAACAGTTCTGTACCTGAA	329	FS	1,0
<b>UTX_7F</b> <b>UTX_7R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CCCACAGCATGTCAGTTGTC CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TAGCCATGGCAACCAATACA	376	FS	1,0
<b>UTX_8F</b> <b>UTX_8R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GACTGTGATAATGTTTGATGCTTTG CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CAGCAAGCACTCCTTGGA	333	FS	1,0
<b>UTX_9F</b> <b>UTX_9R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TGATGTTAAAGAAACATTCAATAAT GG CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CCACATATTTGCCACACTCG	329	FS	1,0
<b>UTX_10F</b> <b>UTX_10R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TTGGTTTGTCTTGCTTCG CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG	354	FS	1,0

	CTTTCAGGAATCTTGGTTAATAATG			
<b>UTX_11F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	351	FS	1,5
<b>UTX_11R</b>	GGTTTGTGAGGGCAAAT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TGTGATGCAACCATCTTTGT			
<b>UTX_12F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	326	FS	1,0
<b>UTX_12R</b>	CCAAGCAGTTCTTCTGAGTTGA CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CCTGAGTGTTCTGGGGAAAT			
<b>UTX_13F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	334	FS	1,0
<b>UTX_13R</b>	GGTTTATATTCCGGTTACCCTGT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GGCACCTGCAGAACATAACC			
<b>UTX_14F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	374	FS	1,0
<b>UTX_14R</b>	GCCTTTTGGGTGGCTTATT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TTGTTTGCTACCTCTACTCCTTTT			
<b>UTX_15F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	356	FS	2,0
<b>UTX_15R</b>	TCATTTCAGGGAAAGGTTGC CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TCTAAAAATCTCCGTCAATTACCA			
<b>UTX_16_1F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	314	FS	1,0
<b>UTX_16_1R</b>	GAATCCCCTATAGATTCTCTTCCC CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG AGTGTCTGTACTTCCCAGCG			
<b>UTX_16_2F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	378	FS	1,0
<b>UTX_16_2R</b>	AGTGCCTAGCGTCTCTCAGC CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG ACCAGTTCCCCAAACACTTC			
<b>UTX_17_1F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	384	FS	1,0
<b>UTX_17_1R</b>	TGATAACTTTAGGACTTGGGTCAA CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TTTCCTGAAGGCTTGCTCTC			
<b>UTX_17_2F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	366	FS	1,0
<b>UTX_17_2R</b>	ACCTCAGGTGGACAACAAGG CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TGCTGTTGAAATGGCTGAAG			
<b>UTX_17_3F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	369	FS	1,0
<b>UTX_17_3R</b>	TCCACCCAGCTGTTCATACA CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CGGTCCAAATTTCAGCATTC			
<b>UTX_18F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	351	FS	2,0
<b>UTX_18R</b>	CACATCTCATGGACTTGTGC CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG AATGTTTCCTAAAGGGCATCC			
<b>UTX_19F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	376	FS	1,0
<b>UTX_19R</b>	GGAGAAATGTATGTGGTTACTATCT G CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TCTGCCAGTGCTGGAAAAG			

<b>UTX_20F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TGCCGTAAAATGCTTTACCTTC	381	FS	1,0
<b>UTX_20R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GTGTCCTTTCAAAACTCCAAAG			
<b>UTX_21-22F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TGGAAAGGATTGCCAGTTGT	338	FS	1,0
<b>UTX_21-22R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG AATTCCCAATCTAGCACAGGA			
<b>UTX_23F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TTTTTCTGATTGGAACACAAGG	332	FS	1,0
<b>UTX_23R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG AAATGACAAGATTCTGGCTGTC			
<b>UTX_24F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TGTTTCCAAAGACCCATTTTTC	336	FS	1,0
<b>UTX_24R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TGGCAATGTATCCATTAGGAGA			
<b>UTX_25F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TTTGTGACATTTTCTTCCAGTCTT	393	FS	1,0
<b>UTX_25R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CAATTCTATGCAAGGAGTCATTCTT			
<b>UTX_26F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG ACCTGAGCAGGTGATAATGG	318	FS	1,2
<b>UTX_26R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TTGCTTTGATGTCAACGTAATTC			
<b>UTX_27F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG ACAAATAATTTCTCCCCACAA	300	FS	1,0
<b>UTX_27R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TGGCTAAGCAACAAAATTGAA			
<b>UTX_28F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CTGTCCACAATTTCAATCAAGTAG	334	FS	1,0
<b>UTX_28R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG AGAGCAAACACTGCTGCTTC			
<b>UTX_29F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TTAGGAAGATTGGCTGAATGG	333	FS	1,0
<b>UTX_29R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TGGAAGGTTGCATAGACACAG			
<b>WT1_7F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GACCTACGTGAATGTTACATG	349	FS	1,0
<b>WT1_7R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG ACAACACCTGGATCAGACCT			
<b>WT1_9F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TGCAGACATTGCAGGCATGGCAGG	349	FS	1,0
<b>WT1_9R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GCACTATTCTTCTCTCAACTGAG			
<b>ZRSR2_1F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GTGCCCCGTCTCGACTCTTAG	363	FS	1,0
<b>ZRSR2_1R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GCCATCTATCATCGCCTCAT			
<b>ZRSR2_2F</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TCCTCAGCACCCGAAGTATT	323	FS	1,0



<b>ZRSR2_2R</b>	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TACTTGGGGGCAGAAGTCAC			
<b>ZRSR2_3F</b> <b>ZRSR2_3R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GCCACCCCTATTGTCCTTTT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GACTGGTACTGGTTAGTAAAGGTTG A	352	FS	1,0
<b>ZRSR2_4F</b> <b>ZRSR2_4R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TTTGCTCTCGTGTGTGTGTG CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GAGATGGAGTTCCGCTCTTG	330	FS	1,0
<b>ZRSR2_5F</b> <b>ZRSR2_5R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TGTGCGCTGTATGTGAAATG CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GACCCGAAGAAGAGCATCAG	330	FS	1,0
<b>ZRSR2_6F</b> <b>ZRSR2_6R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TCAAAAGATCTGTGATTCAAAAGAA CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG CACAGGGGTCATGAATACCA	385	FS	2,0
<b>ZRSR2_7F</b> <b>ZRSR2_7R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GGAGCCAAGAGAGACATGGA CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GGGAACTCAAAAACGTCAGC	379	FS	1,0
<b>ZRSR2_8F</b> <b>ZRSR2_8R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CCACCATGCCTGGTCTAAAG CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG TGTGTCCCAGCTCTCTTGTG	375	FS	1,0
<b>ZRSR2_9F</b> <b>ZRSR2_9R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG GGGAATGTTAGCCTGGACAA CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GAACACGCCATTGCACTCTA	340	FS	1,0
<b>ZRSR2_10F</b> <b>ZRSR2_10R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG TTTGGGAGCTTGACCATTTT CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG ATACTGGGTTTCCCCCAAAG	347	FS	1,0
<b>ZRSR2_11_1F</b> <b>ZRSR2_11_1R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG AGTGCTGTTTCATCACTGTGC CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG GCGGTCCCTATTTCTTCCTC	379	FS	1,0
<b>ZRSR2_11_2F</b> <b>ZRSR2_11_2R</b>	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG CAGGGGGAAGAAATCTCACA CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG AACCCATCTGCGTTCATAGC	329	FS	1,0

## Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Andreas Hochhaus danken, der als Direktor die Abteilung Hämatologie und Internistische Onkologie der Klinik für Innere Medizin II am Universitätsklinikum Jena leitet und das Entstehen dieser Promotionsarbeit ermöglichte.

Das Promotionsthema erhielt ich von Herrn PD Dr. med. Thomas Ernst, der die Arbeitsgruppe mit fachlicher Kompetenz und viel Leidenschaft leitet. Er begegnete mir immer mit einem offenen Ohr und großem Verständnis für meine Fragen. Ich danke ihm sowohl für die praktischen Ratschläge als auch für seine freundliche Betreuung und unermüdliche Motivation, mit der er mich bei der Fertigstellung der Arbeit begleitete.

Außerdem möchte ich mich beim Interdisziplinären Zentrum für klinische Forschung der Universität Jena für die finanzielle Unterstützung bedanken.

Des Weiteren bedanke ich mich beim onkologischen Forschungslabor für die hervorragende Zusammenarbeit. Besonders erwähnen möchte ich Jenny Rinke, Anja Waldau und Vivien Schäfer aus der AG Ernst, die mir die Grundlagen des experimentellen Arbeitens vermittelten. Jenny Rinke unterstützte mich tatkräftig beim Einstieg in die Laborarbeit und stand mir beim Finden von Problemlösungen immer zur Seite. Auch weiß ich ihre Bereitschaft zur aufwendigen Arbeit des Korrekturlesens sehr zu schätzen.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Bernd Gruhn aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität Jena für das Bereitstellen der Proben sowie Frau Prof. Dr. med. Claudia Haferlach vom Münchner Leukämie Labor (MLL) für die Durchführung der FISH-Analyse an ausgewählten Zellen.

Ein liebevolles Dankeschön gebührt meinem Freund Jonas Loster, der mich stets zum Weitermachen motivierte und mir immer zur Seite stand.

Schließlich bedanke ich mich bei meinen Eltern, Geschwistern und Freunden, die mich durch das Studium begleiteten und mir Mut, Unterstützung und Durchhaltevermögen gaben.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich- Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. med. habil. Th. Ernst, Prof. Dr. med. A. Hochhaus,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 06.05.2018

Melinda Busch

## **Publikation**

Thomas Ernst, Melinda Busch, Jenny Rinke, Jana Ernst, Claudia Haferlach, James F. Beck, Andreas Hochhaus, Bernd Gruhn.

Frequent *ASXL1* mutations in children and young adults with chronic myeloid leukemia.

**Leukemia** (zur Publikation angenommen)

## **Präsentationen**

### **Postervorstellung und Erhalt des Posterpreises in der Kategorie**

#### **„Chronische myeloische Leukämie“**

Melinda Busch, Jenny Rinke, Vivien Schäfer, Anja Waldau, Jana Ernst, Claudia Haferlach, Andreas Hochhaus, Bernd Gruhn, Thomas Ernst

***BCR-ABL*-unabhängige Genmutationen bei Kindern und jungen Erwachsenen mit chronischer myeloischer Leukämie**

Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie, Leipzig, 2016

### **Postervorstellung und Erhalt des Posterpreises in der Kategorie**

#### **„Hämatologie, Pneumologie, Infektiologie“**

Melinda Busch, Jenny Rinke, Vivien Schäfer, Anja Waldau, Jana Ernst, Claudia Haferlach, Andreas Hochhaus, Bernd Gruhn, Thomas Ernst

***BCR-ABL*-unabhängige Genmutationen bei Kindern und jungen Erwachsenen mit chronischer myeloischer Leukämie**

Jahrestagung der Gesellschaft für Innere Medizin Thüringens e.V. (GIMEDT), Jena, 2016